

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Untersuchungen zum Einfluss von Glycin auf die Schädigung des Dünndarms der
Ratte durch absolute mesenteriale Ischämie und Reperfusion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Vanessa Elisabeth Bergs

aus Moers

2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. F. Petrat
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. E. Cario

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Akute mesenteriale Ischämie	6
1.1.1	Definitionen und Klassifikation.....	6
1.1.2	Epidemiologie	7
1.1.3	Ätiologie	7
1.1.4	Klinisches Erscheinungsbild	9
1.1.5	Diagnostik	10
1.1.6	Therapie.....	11
1.1.7	Prognose.....	13
1.2	Blutversorgung des Darms.....	14
1.2.1	Kollateralkreisläufe der <i>Arteria mesenterica superior</i>	16
1.2.2	Physiologische Grundprinzipien der Darmdurchblutung	18
1.3	Intestinale Ischämie- und Reperfusionsschädigung	18
1.3.1	Pathophysiologie der intestinalen Ischämie- und Reperfusionsschädigung ...	19
1.3.2	Pathomorphologie der intestinalen Ischämie- und Reperfu- schädigung.....	22
1.4	Glycin.....	23
1.4.1	Glycin als Schutzstoff bei intestinaler Ischämie- und Reperfu- schädigung.....	24
1.5	Problemstellung und Ziele der Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Pharmaka und Chemikalien	27
2.1.2	Hilfsmittel und Geräte.....	28
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Die Versuchstiere.....	31
2.2.2	Aufbau der Versuchsserien	31
2.2.3	Die Versuchsgruppen.....	33
2.2.4	Das Tiermodell: Anästhesie und operative Eingriffe	34

2.2.4.1	Anästhesie und Analgesie	34
2.2.4.2	Katheterisierung der Femoralgefäße	34
2.2.4.3	Induktion von segmentaler absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms	35
2.2.4.4	Dünndarmentnahme und Euthanasie der Tiere	37
2.2.5	Das Tiermodell: Monitoring und Blutuntersuchungen	37
2.2.5.1	Biomonitoring der Vitalparameter	37
2.2.5.2	Monitoring der Mikrozirkulationsparameter des Dünndarms	38
2.2.5.3	Blutentnahme, Blutgasanalyse und Bestimmung von Parametern im Blutplasma	38
2.2.6	Gewebeschädigungsparameter des Dünndarms.....	39
2.2.6.1	Bestimmung des Dünndarmgewichts	39
2.2.6.2	Bestimmung der Längenänderung der Dünndarmsegmente durch Gewichte	40
2.2.6.3	Bestimmung des Nass-Trockengewichts	40
2.2.6.4	Histologische Aufarbeitung und histopathologische Beurteilung der Dünndarmschädigung	40
2.2.6.5	Beurteilung der Dünndarmschädigung durch einen makroskopischen Score.....	41
2.2.6.6	Bestimmung von Gewebeschädigungsparametern der Dünndarm- segmente im Darmhomogenat und Überstand des Darmhomogenats.....	42
2.2.6.6.1	Bestimmung der Saccharase-Aktivität	43
2.2.6.6.2	Nachweis von Hämoglobin anhand der Soret-Bande des Hämoglobins	43
2.2.6.6.3	Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität	44
2.2.7	Statistik	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Modell der absoluten Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms	45
3.2	Effekte von Glycin auf hämodynamische und systemische Parameter bei segmentaler absoluter Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms	45
3.2.1	Einfluss auf die Vitalparameter	45

3.2.2	Einfluss auf die Mikrozirkulationsparameter des Dünndarms.....	48
3.2.3	Einfluss auf die Parameter der Blutgasanalyse, die Plasmaenzym- aktivitäten und die Aminosäurenkonzentrationen im Blut.....	52
3.3	Effekte von Glycin auf die Gewebeschädigungsparameter des Dünndarms bei segmentaler absoluter Ischämie und Reperfusion.....	53
3.3.1	Einfluss auf das Dünndarmgewicht	53
3.3.2	Einfluss auf die gewichtsabhängige Längenänderung des post- ischämischen Dünndarms	54
3.3.3	Einfluss auf das Ausmaß von Gewebeödemen der Darmwand	56
3.3.4	Einfluss auf die makroskopisch quantifizierte Schädigung.....	58
3.3.5	Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes	60
3.3.6	Einfluss auf die funktionelle Integrität des Dünndarms	62
3.3.7	Einfluss auf die Präsenz neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe....	64
3.3.8	Einfluss auf die mikroskopisch quantifizierte Schädigung.....	65
4	Diskussion	68
4.1	Das <i>no-flow</i> -Tiermodell	68
4.2	Die intestinale Ischämie- und Reperfusionsschädigung im <i>no-flow</i> -Modell.....	70
4.3	Glycin als Schutzstoff der absoluten intestinalen Ischämie und Reperfusion.....	75
4.4	Potentielle Schutzmechanismen von Glycin im <i>no-flow</i> -Tiermodell	79
4.5	Ausblick	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	92
7.1	Abkürzungsverzeichnis	92
7.2	Abbildungsverzeichnis	92
7.3	Tabellenverzeichnis	93
7.4	Danksagung.....	94
7.5	Lebenslauf	95

1 Einleitung

1.1 Akute mesenteriale Ischämie

1.1.1 Definitionen und Klassifikation

Das Wort „Ischämie“ stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus *ischein* „hemmen“ und *haima* „Blut“ zusammen (Drosdowski, G. et al., 1977). Ischämie wird definiert als Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Organs, eines Organteils oder eines Gewebes infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr. Die Folgen einer Ischämie sind hypoxische und bei längerem Bestehen nekrotische Veränderungen des betroffenen Gewebes (Pschyrembel, W., 2012). Prinzipiell muss eine *low-flow*-Ischämie von einer *no-flow*-Ischämie unterschieden werden (Jennings, R.B., 1970). Bei einer *low-flow*-Ischämie wird das betroffene Gebiet von einem minimalen Blutfluss versorgt, der aber keine adäquate Sauerstoffversorgung aufrechterhalten kann. Im Gegensatz dazu spricht man von einer *no-flow*- oder absoluten Ischämie, wenn ein Gewebe überhaupt nicht mit Blut und somit nicht mit Sauerstoff versorgt wird (Jennings, R.B., 1970; Petrat, F. et al., 2012). Der „Infarkt“, von Lateinisch *infarcire* „hineinstopfen“, hingegen wird definiert als Nekrose eines Organs, eines Organteils oder eines Gewebes durch Ischämie infolge eines akuten Arterienverschlusses bei Fehlen eines den Verschluss kompensierenden Kollateralkreislaufs (Pschyrembel, W., 2012).

Die intestinale Ischämie lässt sich in drei Hauptkategorien einteilen: akute mesenteriale Ischämie, chronische mesenteriale Ischämie und ischämische Kolitis (Yasuhara, H., 2005). Die akute mesenteriale Ischämie wird ausgelöst durch eine kritische Reduktion des intestinalen Blutflusses (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). In den meisten Fällen führt dies zu einer Darmnekrose. Die Begriffe „akute mesenteriale Ischämie“ und „Mesenterialinfarkt“ werden oft fälschlicherweise synonym benutzt. Das Krankheitsbild ist mit einer hohen Mortalität assoziiert und somit ein potentiell tödlicher vaskulärer Notfall (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). Es werden eine arteriell okklusive, eine arteriell nicht-okklusive und eine venöse Form unterschieden (Klar, E. et al., 2012). Die arteriell okklusive Form wird definiert als ein plötzlicher Verschluss einer Viszeralarterie durch einen Embolus oder durch eine Thrombose aufgrund einer vorbestehenden Wandveränderung (modifiziert nach Klar et al., 2012 (Klar, E. et al., 2012)). Davon abgegrenzt wird die arteriell nicht-okklusive Form als eine funktionell-spastisch verursachte Perfusionsstörung des gesamten mesenterialen Stromgebietes ohne nachweisbaren mechanischen Gefäßverschluss (Eckstein, H.H., 2003). Als venöse Form wird die Thrombose der mesentericoportalen Achse bezeichnet (Klar, E. et al., 2012). In der Klassifikation nach ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), dem wichtigsten,

weltweit anerkanntem Diagnoseklassifikationssystem der Medizin, wird das Krankheitsbild „akute mesenteriale Ischämie“ der Kategorie „Akute Gefäßkrankheiten des Darmes (K55.0)“ zugeordnet (ICD-10-GM-Katalog, Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information, 2014).

1.1.2 Epidemiologie

Es wird davon ausgegangen, dass bei über 70-jährigen Menschen circa 10% der abdominalen Beschwerden auf eine intestinale Minderdurchblutung zurückzuführen sind (Debus, E.S. et al., 2011). Allerdings betrifft das Krankheitsbild der akuten mesenterialen Ischämie nur 1-2% aller Patienten mit akutem Abdomen und ist für weniger als eine von 1000 stationären Aufnahmen verantwortlich (Luther, B.L.P., 2011; Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Insgesamt liegt die jährliche Erkrankungshäufigkeit bei circa 100 Patienten auf 1.000.000 Einwohner. Das entspricht in der Bundesrepublik Deutschland circa 8.000 Patienten im Jahr mit dem Krankheitsbild der akuten mesenterialen Ischämie (Luther, B.L.P., 2001). Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 67 Jahren und das Verhältnis von betroffenen Männern zu Frauen liegt bei 1:1,5 (Eckstein, H.H., 2003; Cudnik, M.T. et al., 2013).

In circa 85% der Fälle von intestinaler Ischämie ist die *Arteria mesenterica superior* betroffen. Dies ist anatomisch bedingt durch den steilen Winkel des Gefäßabganges von der Aorta und durch ihre hohe basale Fließgeschwindigkeit (Wallner, H., 2008; Bobadilla, J.L., 2013). Die restlichen 15% der Fälle von intestinaler Ischämie verteilen sich zu etwa gleichen Teilen auf den *Truncus coeliacus* und die *Arteria mesenterica inferior* (Wallner, H., 2008).

1.1.3 Ätiologie

Das Krankheitsbild der akuten mesenterialen Ischämie lässt sich pathologisch und histopathologisch in insgesamt vier klinische Hauptkategorien einteilen: akute mesenteriale Embolie, akute mesenteriale Thrombose, nonokklusive mesenteriale Ischämie (NOMI/NOD (*non-occlusive disease*)) und mesenteriale Venenthrombose (Debus, E.S. et al., 2011). Am häufigsten ist die mesenteriale Ischämie durch eine akute mesenteriale Embolie (40-50%) oder eine akute mesenteriale Thrombose (25-30%) bedingt. In circa 20% der Fälle tritt eine nonokklusive mesenteriale Ischämie auf. Seltener kommt es zu einer mesenterialen Venenthrombose (10-15%) (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). In circa 2% der Fälle präsentiert sich eine ätiologische Sonderform. Unter die ätiologische Sonderform fallen beispielsweise Dissektionen der *A. mesenterica superior*, Vaskulitiden wie der *Lupus erythematoses* oder die *Endangiitis obliterans*, Strangulationen des Darmrohrs durch

Briden oder externe Kompressionen durch ein Aneurysma oder einen Tumor (Luther, B.L.P., 2011).

Die meisten arteriellen Embolien, die zu einem Verschluss einer mesenterialen Arterie führen, sind durch einen muralen kardialen Thrombus bedingt (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). Risikofaktoren für die Entstehung eines intrakardialen Thrombus sind beispielsweise die koronare Herzkrankheit, insbesondere der Zustand nach Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen, speziell Vorhofflimmern, Endokarditiden, Kardiomyopathien, ventrikuläre Aneurysmen oder valvuläre Störungen (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008; Klar, E. et al., 2012). Der embolische Verschluss liegt normalerweise 6-8 cm distal des Ursprungs der *A. mesenterica superior* und ist in der Nähe des Abgangs der *A. colica media* lokalisiert (Debus, E.S. et al., 2011). Das bedeutet, dass das proximale Jejunum von der Ischämie meist nicht betroffen ist (Yasuhara, H., 2005). In der Minderzahl der Fälle (<15%) setzt sich der Embolus bereits am Abgang der *A. mesenterica superior* fest und die Ischämie betrifft somit das gesamte Versorgungsgebiet der *A. mesenterica superior* (Bobadilla, J.L., 2013).

Die akute mesenteriale Thrombose ist fast immer mit einer schweren Arteriosklerose vergesellschaftet. 50-70% der Patienten haben vor Auftreten der akuten mesenterialen Thrombose Symptome wie postprandiale Bauchschmerzen oder Gewichtsverlust geboten, die zu einer chronischen mesenterialen Ischämie passen (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). Risikofaktoren für die thrombotische Genese der akuten mesenterialen Ischämie sind unter anderem arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Nikotinabusus und Hyperlipoproteinämie (Wolf, A.M., Henne-Bruns, D., 2003; Luther, B.L.P., 2011). Im Regelfall befindet sich der thrombotische Verschluss der *A. mesenterica superior* innerhalb einer Strecke von drei Zentimetern von ihrem Ursprung von der Aorta (Schneider, T.A. et al., 1994). Typischerweise ist somit der Intestinaltrakt vom Duodenum bis zum Kolon transversum von der Ischämie betroffen (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008).

Die Ursachen der nonokklusiven mesenterialen Ischämie sind vielfältig, aber alle führen zu einer anhaltenden intestinalen Vasokonstriktion mit reduziertem Blutfluss (Bobadilla, J.L., 2013). Gehäuft zu finden ist die nonokklusive mesenteriale Ischämie bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz, kardiogenem Schock, Hypotonie, zum Beispiel durch Schock oder Sepsis, oder bei Patienten mit Hypovolämie, beispielsweise aufgrund von Dialyse, Blutverlust oder Exsikkose. Eine weitere Ursache kann die Einnahme vasopressiver Medikamente wie Digitalis, Ergotaminpräparate oder α -Agonisten sein (Wallner, H., 2008; Bobadilla, J.L., 2013).

Die mesenteriale Venenthrombose wird ätiologisch in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilt (Yasuhara, H., 2005). Die primäre idiopathische mesenteriale Venenthrombose tritt in circa 20% der Fälle auf. Der Großteil der mesenterialen

Venenthrombosen (circa 80%) haben sekundäre Ursachen wie Hyperkoagulabilität, beispielsweise aufgrund einer Faktor-V-Leiden-Mutation oder eines Antithrombin-III-Mangels, maligne Erkrankungen, Pankreatitis oder Splenomegalie (Yasuhara, H., 2005).

1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild der mesenterialen Ischämie kann stark variieren von stärksten Bauchschmerzen ohne auffälligem körperlichen Untersuchungsbefund bis hin zu fehlenden Bauchschmerzen (Cudnik, M.T. et al., 2013). Typischerweise läuft eine mesenteriale Ischämie in drei Phasen ab (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Im Initialstadium, den ersten 6 Stunden der Ischämie, gibt es im Regelfall eine Diskrepanz zwischen den starken diffusen Bauchschmerzen und dem blanden klinischen Befund des Bauches. Der Bauch ist weich und die Peristaltik normal. Oft ist der Bauchschmerz in diesem Stadium von Schock und Diarrhö begleitet. Gewöhnlich folgt ein stilles Intervall nach 7 bis 12 Stunden Ischämie. Die starken akuten Bauchschmerzen nehmen ab und gehen in einen dumpfen Bauchschmerz über. Es ist das Stadium der Darmparalyse, dementsprechend nimmt die Peristaltik ab. Der Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert sich rasch. Das Endstadium nach 12 bis 24 Stunden Ischämie präsentiert sich als akutes Abdomen. Es kann sich als Ileus, als bakterielle Durchwanderungsperitonitis, als Sepsis und/oder als Multiorganversagen darstellen. Das Endstadium ist oft mit blutiger Diarrhö und Erbrechen vergesellschaftet (Debus, E.S. et al., 2011; Luther, B.L.P., 2011; Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011).

Der Beginn der Symptomatik ist aufgrund der unterschiedlichen Ätiologien verschieden (Oldenburg, W.A. et al., 2004). Bei einem embolischen Verschluss setzen die Symptome plötzlich ein wegen des Fehlens einer kollateralen Blutzirkulation. Bei Patienten mit einer arteriellen mesenterialen Thrombose beginnen die Schmerzen dagegen gewöhnlich schleichend. Aufgrund des langsamen Fortschreitens der Arteriosklerose kann zunächst ein Kollateralkreislauf, der die Blutversorgung des Darms in einem gewissen Maße aufrechterhält, ausgebildet werden. Die mesenteriale Ischämie erfolgt erst, wenn die letzte Viszeralarterie oder eine wichtige Kollateralarterie okkludiert ist. Dann klagen die Patienten über einen konstanten Bauchschmerz. Bei einer nonokklusiven mesenterialen Ischämie ist der Beginn akut oder subakut. Sie betrifft im Allgemeinen ältere und kritisch kranke Patienten. Oft sind diese Patienten intubiert und sediert. Die mesenteriale Venenthrombose beginnt in der Regel subakut. Die Patienten mit mesenterialer Venenthrombose klagen üblicherweise über diffuse unspezifische Bauchschmerzen und werden meist erst ein bis zwei Wochen nach Symptombeginn vorstellig (Oldenburg, W.A. et al., 2004).

1.1.5 Diagnostik

Da es sich bei der mesenterialen Ischämie um eine seltene Erkrankung mit unspezifischen Symptomen handelt, ist der entscheidende diagnostische Schritt eine sorgfältige Anamneseerhebung, um das Krankheitsbild in die differentialdiagnostischen Überlegungen miteinbeziehen zu können (Wallner, H., 2008; Bobadilla, J.L., 2013). Bei der klinischen Untersuchung eines Patienten können eine diffuse Druckempfindlichkeit des Abdomens, das Vorhandensein von Zeichen einer Peritonitis und eine abdominale Distension Indizien für eine mesenteriale Ischämie sein (Cudnik, M.T. et al., 2013).

Die akute mesenteriale Ischämie erfordert eine Notfalldiagnostik (Klar, E. et al., 2012). Laborchemisch gibt es viele Parameter, die auf eine mesenteriale Ischämie hinweisend sind wie Laktat, D-Dimere, ischämie-modifiziertes Albumin, I-FABP (*intestinal fatty acid-binding protein*) und GST (α -glutathione S-transferase) (Kanda, T. et al., 1996; Cudnik, M.T. et al., 2013). Es gibt aber leider keinen laborchemischen Test, dessen Ergebnis in der Notfallsituation schnell verfügbar ist und genug diagnostische Sicherheit bietet (Cudnik, M.T. et al., 2013). Im Spätstadium der Darmnekrose sind normalerweise folgende Parameter verändert: Laktat (>4 mmol/l), C-reaktives Protein (CRP) (>10 mg/l), Leukozyten ($>15.000/\text{ml}$), pH ($<7,2$) und Basenüberschuss (*Base Excess, BE*) (<-7 mmol/l) (Debus, E.S. et al., 2011).

In der Bildgebung spielt die konventionelle abdominelle Röntgenübersichtsaufnahme eine untergeordnete Rolle, da ein pathognomonischer Nachweis von intramuraler Luft nur selten gelingt (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Allerdings ist diese Bildgebung zum Ausschluss anderer Differenzialdiagnosen eines akuten Abdomens wie einer freien Perforation nützlich. Das gilt auch für die Abdomen-Sonographie, gegebenfalls in Kombination mit einer Dopplersonographie. Ein sonographischer Nachweis von Durchblutungsstörungen gelingt wegen einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der *A. mesenterica superior* und aufgrund häufig vorliegender Darmgasüberlagerung nur in wenigen Fällen. Lange Zeit galt die angiographische Darstellung (digitale Subtraktionsangiographie, DSA) der mesenterialen Gefäße als Goldstandard, da eine sichere Diagnosestellung möglich ist und gleichzeitig eine endovaskuläre Therapiemöglichkeit zur Verfügung steht. Aufgrund der Invasivität des Verfahrens, des hohen zeitlichen Aufwandes, der hohen Applikationsmengen an Kontrastmittel und der fehlenden Beurteilbarkeit des von der Minderperfusion betroffenen Darmabschnittes ist die angiographische Darstellung allerdings in den Hintergrund gerückt. Heutzutage ist die Multidetektor-Spiral-Computertomographie (*multidetector computed tomography*, MDCT) wegen der ubiquitären Verfügbarkeit, der geringen Invasivität und der guten Beurteilbarkeit von intravaskulären und intraabdominellen Pathologien das Standarddiagnostikum der akuten mesenterialen Ischämie (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Sie

erlaubt, falls notwendig, die multiplanare Rekonstruktion (MPR) der Mesenterialgefäße im Sinne der computertomographischen Angiographie (CTA) (Klar, E. et al., 2012). So kann das Vorhandensein einer intestinalen Pneumatosis, von Luftansammlungen in der Portalvene, von Wandödemen in einem betroffenen Darmsegment, einer abnormalen Gasverteilung und das Vorhandensein eines Organinfarkts sicher beurteilt werden (Debus, E.S. et al., 2011). Die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Magnetresonanz-Angiographie (MR-Angiographie) haben eine niedrige Sensitivität und Spezifität in der Detektion der mesenterialen Ischämie und spielen daher keine Rolle in der Notfalldiagnostik (Debus, E.S. et al., 2011).

Die chirurgische Exploration ist ein relevantes und sicheres Diagnostikum. Dies gilt insbesondere bei Patienten mit Zeichen einer bakteriellen Translokation, einer fortgeschrittenen Ischämie oder einer Peritonitis (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011).

1.1.6 Therapie

Eine frühzeitige Diagnose ist wesentlich für eine erfolgreiche Behandlung der mesenterialen Ischämie (Cudnik, M.T. et al., 2013). Die Grundprinzipien der Therapie der akuten mesenterialen Ischämie sind die Wiederherstellung der arteriellen Perfusion ischämischer, aber potentiell lebensfähiger, Darmanteile, die Resektion infarzierter Darmanteile und die Vermeidung einer erneuten Ischämie (Eckstein, H.H., 2003).

Da die akute mesenteriale Ischämie ein potentiell tödlicher vaskulärer Notfall ist, ist jeder Patient nach intensivmedizinischen Prinzipien zu behandeln (Klar, E. et al., 2012). Zu der intensivmedizinischen Basistherapie gehört der Ausgleich der Flüssigkeitsbilanz über einen zentralvenösen Katheter (ZVK), eine ausreichende Antikoagulation (5.000 IE Heparin intravenös als Bolus, anschließend 20.000 IE Heparin/24h Perfusor-gesteuert), die Kreislaufstabilisierung mit einem mittleren arteriellen Zielblutdruck von 120-140 mmHg, eine kalkulierte Antibiose gegen gram-negative und gram-positive Erreger, beispielsweise ein Cephalosporin der 2. Generation in Kombination mit Metronidazol, und eine ausreichende Analgesie (Luther, B.L.P., 2011; Klar, E. et al., 2012).

Prinzipiell gibt es eine endovaskuläre und eine chirurgische Therapieoption. Grundsätzlich muss bei einer Präsenz von klinischen Zeichen einer Peritonitis oder einer Perforation eine Notfall-Laparotomie durchgeführt werden (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). Wenn dies nicht der Fall ist, sollte die Möglichkeit der endovaskulären Rekonstruktion abgewogen werden, insbesondere bei Patienten mit mehrfachen abdominalen Voroperationen, hoher Komorbidität (ASA (*American Society of Anesthesiologists Classification*) >3), peripheren und segmentalen Verschlussprozessen ohne Peritonitis oder einer nonokklusiven

mesenterialen Ischämie (Debus, E.S. et al., 2011). Allgemein wird das Vorgehen durch die vermutete Ursache der mesenterialen Ischämie bestimmt (s. Abb.1).

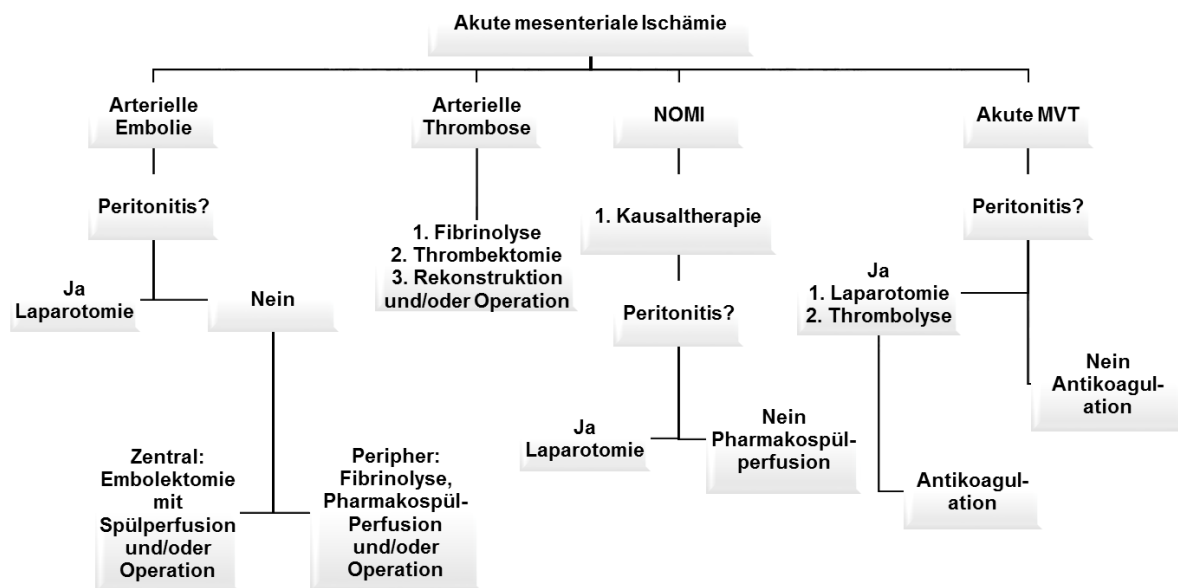


Abbildung 1: Therapiealgorithmus der akuten mesenterialen Ischämie (modifiziert nach Luther, B.L.P., 2011 und der American Gastroenterological Association, 2000).

Je nach vermuteter Ätiologie und Begleitumständen werden unterschiedliche Therapieoptionen favorisiert (nähere Erläuterungen im Text).

Abkürzungen: NOMI = nonokklusive mesenteriale Ischämie, MVT = mesenteriale Venenthrombose.

Es gilt das Grundprinzip „Revaskularisation vor Darmresektion“ (Ellis, J., Sarac, T.P., 2010). Bei einer arteriellen Embolie sollte primär abgeschätzt werden, ob eine Revaskularisation durch Embolektomie mittels einer queren Arteriotomie und anschließender Embolektomie mit einem Fogarty-Katheter möglich ist (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Bei einer arteriellen Thrombose kann die Revaskularisation über eine Thromboendarteriotomie mittels einer Längsarteriotomie und anschließender Patch-Angioplastik erfolgen (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008). Auch ein mesenterialer arterieller Bypass kommt in Betracht. Dieser kann antegrad von der supracelialen Aorta oder retrograd von der infrarenalen Aorta oder einer iliakalen Arterie ausgehen. Als Transplantat kann eine autologe *V. saphena* oder eine Prothese verwendet werden (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008; Sise, M.J., 2014). Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) mit Einsetzen eines Stents (Klar, E. et al., 2012). Wenn eine Revaskularisationsmaßnahme abgeschlossen wurde, sollte circa 30 Minuten abgewartet werden bis die Entscheidung über eine Darmresektion und ihr Ausmaß gefällt wird (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Zeichen der Revitalisierung sind die Rotverfärbung der Serosa, das Wiedereinsetzen der intestinalen Peristaltik, Pulsationen in den mesenterialen Arkaden und ein tastbarer Puls der *A. mesenterica superior* (Debus, E.S. et al., 2011; Sise, M.J., 2014). Für das

Resektionsausmaß muss bedacht werden, dass trotz normaler Serosafärbung eine ausgeprägte Innenschichtischämie vorliegen kann (Eckstein, H.H., 2003). Bei einem bewussten Zurücklassen fraglich durchbluteter Darmabschnitte ist eine Second-Look-Operation in einem Zeitintervall von 8 bis 12 Stunden obligatorisch durchzuführen (Luther, B.L.P., 2011).

Alleinig, insbesondere bei peripheren Verschlusstypen, oder additiv zu operativen Maßnahmen kann eine Pharmakospülperfusion infundiert werden. Dies ist eine intraarterielle Infusion mit dem Basismedium Ringerlösung mit Zusatz von PGE₁ (Prostaglandin E₁/Alprostadiol 20 µg als Bolus, dann 60-80 µg/24h, alternativ PGI₂ (Prostaglandin I₂/Ipoprostenol) 5-6 ng/kg KGW/min) und Heparin (10.000 IE/l) über einen transfemorale Katheter, dessen Spitze in der *A. mesenterica superior* liegt. Ziel ist die Förderung der Spontanlyse und die Erhöhung der Ischämietoleranz. Im Verlauf sollte jeden zweiten Tag eine angiographische Befundkontrolle erfolgen. Eine weitere Therapieoption ist die Fibrinolyse mit Alteplase (rt-PA, *recombinant tissue-type plasminogen activator*; 20 µg rt-PA als Bolus, anschließend Perfusor-gesteuert) mit täglicher Befundkontrolle (Luther, B.L.P., 2011).

Die Besonderheit der Therapie einer nonokklusiven mesenterialen Ischämie ist, dass zunächst die vermutete Ursache behandelt werden sollte (Yasuhara, H., 2005).

Bei einer mesenterialen Venenthrombose kann eine Thrombolyse über die *A. mesenterica superior*, die *V. jugularis interna* oder die *V. portae* durchgeführt werden. Eine intravenöse Antikoagulation mit Heparin für 7 bis 10 Tage ist notwendig. Anschließend sollte die Antikoagulation oral mit Warfarin oder Cumarinen für 3 bis 6 Monate fortgesetzt werden (Yasuhara, H., 2005).

Die Indikation zu einer (Re-)Exploration muss bei Persistenz peritonitischer Symptome über 24 Stunden, bei einem permanent hohen oder einem wieder ansteigenden Serumlaktat nach 8 Stunden, bei einem Ausbleiben der klinischen Rekonvaleszenz oder bei einem Verdacht auf einen vaskulären Rezidivverschluss großzügig gestellt werden und unverzüglich erfolgen (Luther, B.L.P., 2011; Klar, E. et al., 2012).

1.1.7 Prognose

Die entscheidenden Prädiktoren für den Verlauf einer akuten mesenterialen Ischämie sind die Zeitspannen bis zur Diagnosestellung und zur enteralen Revaskularisation, sowie die Lokalisation und Genese der mesenterialen Ischämie und das Alter und die Komorbiditäten des Patienten (Klar, E. et al., 2012). Negative Prognosefaktoren sind eine Symptombdauer über 24 Stunden, die nonokklusive mesenteriale Ischämie, ein Alter des Patienten über 75 Jahre und mehr als zwei Vorerkrankungen (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011).

Ausschlaggebend für die Prognose des Patienten ist das Zeitintervall zwischen Symptom- und Therapiebeginn (Eckstein, H.H., 2003). Die Letalität der akuten mesenterialen Ischämie liegt durchschnittlich bei 60-85% (nonokklusive mesenteriale Ischämie >80%, arterielle Ischämie (Embolie, Thrombose) 70-80%, venöse Ischämie 50-70%) (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011). Bei Patienten, die eine akute mesenteriale Ischämie überleben, können unter anderem die folgenden Komplikationen auftreten: Anastomoseninsuffizienzen (bis 60%), Kurzdarmsyndrom (<70-100 cm gesunder Dünndarm), dauerhaft nötige parenterale Ernährung (circa 20%) oder Notwendigkeit einer Dünndarmtransplantation (Eckstein, H.H., 2003; Debus, E.S. et al., 2011).

Abschließend lässt sich sagen, dass nur eine frühzeitige Diagnosestellung und eine zügige Therapie der akuten mesenterialen Ischämie den tödlichen Ausgang verhindern können. Essentiell dafür ist der Verdacht auf eine akute mesenteriale Ischämie aufgrund der Anamnese und des körperlichen Untersuchungsbefundes (Ellis, J., Sarac, T.P., 2010; Bobadilla, J.L., 2013; Sise, M.J., 2014).

1.2 Blutversorgung des Darms

Das viszerale Gefäßnetz ist das am weitesten verzweigte regionale vaskuläre System des menschlichen Organismus (Debus, E.S. et al., 2009). Während der embryonalen Entwicklung entstehen die mesenterialen Gefäße aus primitiven ventralen Segmentarterien (Rosenblum, J.D. et al., 1997). In der Frühphase der embryonalen Entwicklung wird der Verdauungstrakt von einer Vielzahl ventraler Segmentarterien versorgt. Im Laufe der Embryonalentwicklung bilden sich die ventralen Segmentarterien zurück bis auf die 10., 13. und 21. Segmentarterie. Aus diesen drei verbleibenden Segmentarterien entstehen der *Truncus coeliacus*, die *A. mesenterica superior* (AMS) und die *A. mesenterica inferior* (AMI). Aufgrund von partiellen oder atypischen Regressionen oder Persistenzen der primitiven Darmarterien können zahlreiche und äußerst komplexe Anomalien und Anlagevarianten auftreten (Rosenblum, J.D. et al., 1997; Schwilden, E.-D., 2006; Debus, E.S. et al., 2009). Der *Truncus coeliacus* entspringt auf Höhe des zwölften Brustwirbels bis ersten Lumbalwirbels aus der *Aorta abdominalis* und versorgt mit seinen drei Ästen, der *A. splenica*, der *A. gastrica sinistra* und der *A. hepatica communis*, den Ösophagus, den Magen, das Duodenum, die Milz und das hepatobiliäre System (Schwilden, E.-D., 2006; Ellis, J., Sarac, T.P., 2010). Die *A. mesenterica superior* (AMS) ist das wichtigste viszerale Gefäß. Sie hat üblicherweise knapp unterhalb des *Truncus coeliacus* auf Höhe des ersten Lumbalwirbels ihren Ursprung aus der Aorta. Mit ihren Ästen *A. colica media*, *A. colica dextra*, *Aa. pancreaticoduodenales inferiores posterior et anterior*, *A. ileocolica*, *Aa. jejunaes* und *Aa. ilieales* versorgt sie den Pankreaskopf, das Duodenum, den

gesamten Dünndarm und das Kolon bis zur linken Kolonflexur. Die *A. mesenterica inferior* (AMI), die kaliberschwächste Viszeralarterie, entspringt meist auf der Ebene des dritten Lumbalwirbels aus der Aorta. Sie versorgt mit ihren Ästen *A. colica sinistra*, *Aa. sigmoideae* und *A. rectalis superior* das Kolon ab der linken Flexur bis zum Rektum (Kornblith, P.L. et al., 1992; Schwilden, E.-D., 2006; Debus, E.S. et al., 2009; Ellis, J., Sarac, T.P., 2010; Sise, M.J., 2014).

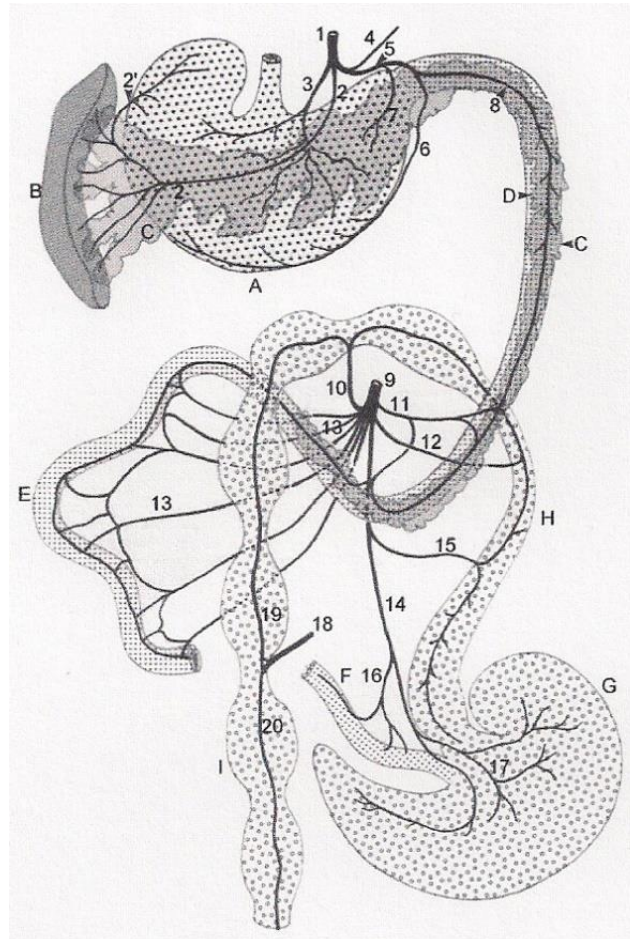


Abbildung 2: Arterien des Gastrointestinaltraktes der Ratte. Dorsale Ansicht (nach Hebel, R., Stromberg, M.W., 1986).

A Magen, B Milz, C Pankreas, D Duodenum, E Jejunum (unterbrochen), F Ileum, G Caecum, H Kolon, I Rektum; 1 *A. celiaca*, 2 *A. lienalis*, 2' *Rr. gastrici breves*, 3 *A. gastrica sinistra*, 4 *A. hepatica*, 5 *A. gastroduodenalis*, 6 *A. gastroepiploica dextra*, 7 *A. gastrica dextra*, 8 *A. pancreaticoduodenalis cranialis*, 9 *A. mesenterica cranialis*, 10 *A. colica media*, 11 *A. pancreaticoduodenalis caudalis*, 12 *A. colica dextra*, 13 *Aa. jejunaes*, 14 *A. ileoceecocolica*, 15 *R. colicus*, 16 *R. ilei*, 17 *R. cecalis*, 18 *A. mesenterica caudalis*, 19 *A. colica sinistra*, 20 *A. rectalis*.

In Abbildung 2 ist die arterielle Versorgung des Gastrointestinaltraktes der Ratte dargestellt. Die Anatomie des Gastrointestinaltraktes der Ratte entspricht größtenteils der Anatomie des Gastrointestinaltraktes des Menschen. Es gibt geringfügige Unterschiede in der Nomenklatur der Anatomie der Ratte und der Nomenklatur der Anatomie des Menschen.

Im weiteren Verlauf wird die Nomenklatur der humanen Anatomie verwendet, auch wenn sich die Beschreibungen auf die Anatomie der Ratte beziehen.

1.2.1 Kollateralkreisläufe der *Arteria mesenterica superior*

Die Äste aller drei mesenterialen Hauptgefäße bilden ein Anastomosensystem, das sich in vielen Gebieten überlappt, sodass eine ergiebige Blutversorgung des gesamten Gastrointestinaltraktes resultiert (Kornblith, P.L. et al., 1992). Die Wechselbeziehungen des vaskulären Systems durch Anastomosen sind von maßgeblicher klinischen Wichtigkeit. Bei einem Verschluss einer Arterie, beispielsweise durch einen Tumor oder eine intrinsische Obstruktion, ist der primäre Weg des Blutflusses gestört und Kollateralen sind unverzichtbar. Die Kollateralen hypertrophieren, um sekundär Blut zu shunten (Kornblith, P.L. et al., 1992). Dies gewährleistet, dass erst Ausfälle größerer oder zentraler Stromgebiete zu einer mesenterialen Ischämie führen. Allerdings reicht dieses System bei einem akuten Verschluss eines Gefäßstammes oder eines nachgeschalteten Hauptastes nicht aus, um eine Mindestperfusion und somit eine Versorgung der Darmschleimhaut mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten (Ritz, J.P., Buhr, H.J., 2011).

Der *Truncus coeliacus* und die *A. mesenterica superior* sind regelhaft durch die sogenannte „Pankreasarkade“ verbunden (s. Abb. 3a).

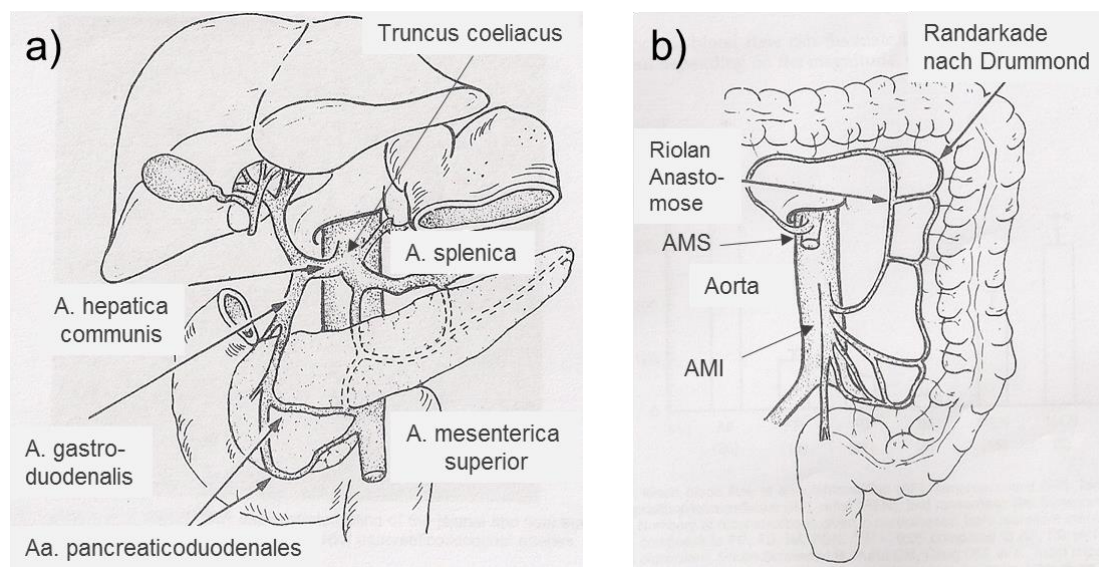


Abbildung 3: Kollateralen der *A. mesenterica superior* (modifiziert nach Rosenblum, J.D. et al., 1997).
a) Kollateralen zwischen dem *Truncus coeliacus* und der *A. mesenterica superior* (AMS),
b) Kollateralen zwischen der *A. mesenterica superior* (AMS) und der *A. mesenterica inferior* (AMI).

Die *Aa. pancreaticoduodenales superiores anterior et posterior* der *A. gastroduodenalis* des *Truncus coeliacus* anastomosieren mit den *Aa. pancreaticoduodenales inferiores anterior et posterior* der *A. mesenterica superior* (Schwilden, E.-D., 2006).

Eine weitere Anastomose der zwei mesenterialen Gefäße kann durch die Verbindung der *A. pancreatica dorsalis* der *A. splenica* mit den *Aa. pancreaticoduodenales inferiores anterior et posterior* oder der *A. colica media* der *A. mesenterica superior* bestehen (Rosenblum, J.D. et al., 1997; Sise, M.J., 2014). Bei 1-2% aller Individuen kommt die sogenannte „Bühler-Anastomose“ vor. Sie stellt eine zusätzliche direkte Verbindung des *Truncus coeliacus* mit dem proximalen Abschnitt der *A. mesenterica superior* durch die Persistenz einer embryonalen Arterie dar (Debus, E.S. et al., 2009).

Zwischen der *A. mesenterica superior* und der *A. mesenterica inferior* können verschiedene Anastomosen vorhanden sein (s. Abb. 3b). In Bezug auf ihr Potential für eine Kollateralkompensation ist die „Riolan-Anastomose“ die wichtigste (Schwilden, E.-D., 2006). Sie ist eine Verbindung der Endabschnitte der *A. colica media* und *A. colica sinistra*, die mit einem gewissen Abstand vom Kolonrahmen zentral im Mesokolon verläuft. Eine zweite Verbindung ist die „Randarkade von Drummond“ („*marginal artery*“). Sie entspricht dem äußersten von den Arterienästen der *A. colica media* und der *A. colica sinistra* ausgehenden Arkadenkomplex, der in direkter Nähe der Darmwand verläuft. In circa 10% der Fälle besteht eine dritte Verbindung, die sogenannte „Anastomose von Williams und Klop“. Hierbei handelt es sich um eine retroperitoneal in der Wurzel des Mesokolons gelegene Gefäßverbindung der *A. mesenterica superior* und der *A. mesenterica inferior* (Schwilden, E.-D., 2006).

Neben den beschriebenen Kollateralkreisläufen ist in der Darmwand selbst ein Netzwerk von kommunizierenden submukosalen Gefäßen vorhanden, die das Überleben von Darmsegmenten kurzzeitig aufrechterhalten können, wenn eine extramurale Blutversorgung ausbleibt (Patel, A. et al., 1992). Die Mikrozirkulation hat ihren Ursprung in den *Vasa recta*, die wiederum aus der äußersten Arkade der Darmarterien, der „Randarkade von Drummond“, entspringen. Nach ihrem Durchtritt durch die *Tunica muscularis* der Darmwand bilden sie einen submukösen Gefäßplexus, der sich als durchgehendes arterielles Netzwerk über die gesamte Länge des Darms erstreckt. Aus diesem submukösen Gefäßplexus entspringt je eine zentrale Arteriole pro Darmzotte und verzweigt sich in jeder Zotte in ein weitreichendes subepitheliales Kapillarnetzwerk. Auf der vaskulären Ebene gibt es keine Möglichkeit der Kollateralkompensation, sodass die Darmzotten am empfindlichsten auf eine Ischämie reagieren (Patel, A. et al., 1992; Schwilden, E.-D., 2006). Dabei spielt der Mechanismus „*Countercurrent exchange*“, ein extravaskulärer Shuntmechanismus, eine große Rolle (Lundgren, O., Haglund, U., 1978). Fettlösliche Substanzen wie Sauerstoff diffundieren von der zentralen Arteriole zur Venole. Das hat zur Folge, dass bei reduziertem Blutfluss die Zottenspitzen zuerst hypoxisch werden (Lundgren, O., Haglund, U., 1978; Schwilden, E.-D., 2006).

1.2.2 Physiologische Grundprinzipien der Darmdurchblutung

Physiologisch wird der Darm mit 20-25% des Herzminutenvolumens in Ruhe und mit bis zu 35% des Herzminutenvolumens postprandial versorgt (Lanciault, G., Jacobson, E.D., 1976; Granger, D.N. et al., 1980). Das entspricht Flussraten von 300-1200 ml/min im *Truncus coeliacus* und der *A. mesenterica superior* (Rosenblum, J.D. et al., 1997). 70% des mesenterialen Blutflusses erhalten die *Tunica mucosa* und die *Tunica submucosa*. Der restliche Anteil des mesenterialen Blutflusses (30%) speist die *Tunica muscularis* und die *Tunica serosa* (Oldenburg, W.A. et al., 2004). Die Durchblutung des Darms wird durch komplexe Interaktionen zwischen intrinsischen und extrinsischen Regulatorsystemen gesteuert (Oldenburg, W.A. et al., 2004). An der intrinsischen Regulation sind metabolische und myogene Regulatorsysteme und an der extrinsischen Regulation nervale und humorale Regulatorsysteme beteiligt. Im Einzelnen spielen als vasoaktive Substanzen beispielsweise Angiotensin II, Adrenalin, Noradrenalin, Vasopressin und Calcium als Vasokonstriktoren und Acetylcholin, Adenosin, Bradykinin, Histamin, Stickstoffmonoxid, Prostaglandine und Kalium als Vasodilatoren des Gastrointestinaltraktes eine Rolle. Weitere wichtige Einflussfaktoren sind die druckgesteuerte Autoregulation, die hypoxische Vasodilatation, die Arteriolen-Spannungsrezeptoren, kardiovaskuläre Faktoren wie die Herzauswurfleistung und der systemische Blutdruck und das autonome Nervensystem mit den sympathischen Efferenzen aus den 5.–11. thorakalen Grenzstrangganglien der *Nervi splanchnici* (Oldenburg, W.A. et al., 2004; Knichwitz, G. et al., 2005; Schwilden, E.-D., 2006). In Ruhe sind nur circa 20% der mesenterialen Kapillaren geöffnet und an der Perfusion beteiligt. Das bedeutet, dass für eine weitgehend normale Sauerstoffversorgung des Darmgewebes 20% des normalen Blutflusses ausreichen (Boley, S.J. et al., 1978; Granger, D.N. et al., 1980). Wenn der mesenteriale Blutfluss auf unter 30 ml/min/100 g Gewebe oder der systemische mittlere arterielle Blutdruck auf unter 50 mmHg fällt, greifen die Autoregulationsmechanismen nicht mehr und die Sauerstoffaufnahme ist flussabhängig (Bulkley, G.B. et al., 1985).

1.3 Intestinale Ischämie- und Reperfusionsschädigung

Es entsteht eine ischämische Schädigung an der Darmwand, wenn dem Gewebe Sauerstoff und Nährstoffe entzogen werden, die notwendig sind für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus und der Zellintegrität (Patel, A. et al., 1992). Dabei verursacht die intestinale Ischämie ein breites Spektrum an Schäden. Sie kann sowohl komplett reversible funktionelle Veränderungen als auch subtile Veränderungen in der Kapillarpermeabilität oder transmurale hämorrhagische Nekrosen bedingen. Die Hypoxie ist das initiale Ereignis und nachfolgend kommt es zur Reperfusionsschädigung, wenn der Blutfluss

wiederhergestellt wird (Patel, A. et al., 1992). Paradoxerweise kann die Gewebeschädigung durch die Reperfusion zunehmen („Sauerstoffparadoxon“) (McCord, J.M., 1985).

1.3.1 Pathophysiologie der intestinalen Ischämie- und Reperfusionsschädigung

Die akute mesenteriale Ischämie führt zu einer Umstellung auf einen anaeroben Metabolismus in der betroffenen Darmregion mit regionaler Azidose und initialer Hyperperistaltik mit krampfhaften Schmerzen und oft plötzlicher Darmentleerung, gefolgt von intensiven ischämischen Schmerzen durch die Darmwandhypoperfusion (Sise, M.J., 2014). Die akute mesenteriale Ischämie löst eine Kaskade von vaskulären und zellulären Reaktionen aus (Luther, B.L.P., 2001). Ein Ungleichgewicht von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf führt zur Freisetzung von lokalen Metaboliten, die zu einer Vasodilatation und Hyperämie führen (Vollmar, B., Menger, M.D., 2011). Des Weiteren lösen bei einer akuten mesenterialen Ischämie sympathische Afferenzen zum Rückenmark ein schwerstes Schmerzsyndrom aus (Eckstein, H.H., 2003). Dies führt reflektorisch zu einem massiven Blutdruckabfall und dadurch dann zu einer massiven Vasokonstriktion der Gefäße durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, die Freisetzung von Endothelin und die Ausschüttung von Adrenalin. Adrenalin aktiviert daraufhin α -adrenerge Rezeptoren und löst so eine spastische Hyperperistaltik aus (Eckstein, H.H., 2003). Aufgrund dieser initialen Reaktionen entsteht aus einer lokalen Ischämie eine Hypoxie größerer Versorgungsgebiete (Luther, B.L.P., 2001).

Eine anhaltende Ischämie führt zu einem Sauerstoffdefizit und einem Energieverlust der betroffenen vaskulären Endothelzellen und nachgeschalteter Zellverbände. Es kommt zu funktionellen Störungen der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien (Luther, B.L.P., 2001). Auf zellulärer Ebene führt der Sauerstoffmangel zum Erliegen der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese über die Cytochrom-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette (de Groot, H., 2005). In der Sauerstoffmangelsituation findet die anaerobe Glykolyse vermehrt statt, aber dennoch kommt es zu einer Verminderung des ATP-Gehalts der Zellen mit Anstieg der Abbaumetabolite von ATP wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Hypoxanthin und konsekutiver Entwicklung einer intrazellulären metabolischen Azidose (Luther, B.L.P., 2001; de Groot, H., 2005). Aufgrund des ATP-Mangels der Zellen kommt es zu Störungen in der Ionenhomöostase, da die aktiven (ATP-abhängigen) Transportprozesse zum Erliegen kommen. Dies führt unter anderem zu einem Einstrom von Natriumionen, Calciumionen und Wasser und einem Ausstrom von Kalium- und Magnesiumionen, was in einer ödematösen Anschwellung der betroffenen Zellen resultiert (Mallick, I.H. et al., 2004). Die Störungen der Ionenhomöostase scheinen an der Bildung eines mitochondrialen Permeabilitätsübergangs und so,

insbesondere während der Reperfusion, an der Einleitung mitochondrialer Wege der Apoptose über Cytochrom-C-Freisetzung und Caspasen-Aktivierung beteiligt zu sein (de Groot, H., 2005). Eine wichtige Konsequenz des Anstieges des intrazellulären Calciumspiegels ist die Aktivierung einer Calcium-abhängigen Protease, die die Xanthin-Dehydrogenase irreversibel in die Xanthin-Oxidase umwandelt (Mallick, I.H. et al., 2004). Des Weiteren hat der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels zur Folge, dass Hydrolasen wie Phospholipasen und Proteasen aktiviert werden (de Groot, H., 2005). Sie können über den Abbau ihrer Substrat-Makromoleküle, beispielsweise über den Abbau von Plasmamembranbestandteilen oder anderen Zellbausteinen, die Permeabilität der Plasmamembran erhöhen und den Zelluntergang einleiten. Die Bildung sogenannter „pathologischer Poren“ trägt wahrscheinlich dazu bei (de Groot, H., 2005; de Groot, H., Rauen, U., 2007). Weitere Gründe für eine Gewebeschädigung durch eine intestinale Ischämie ist der fehlende Abtransport von Stoffwechselendprodukten wie Kohlenstoffdioxid, Wasserstoffionen, Laktat und Kalium (Knichwitz, G. et al., 2005). Die durch das Sauerstoff- und Energiedefizit entstandene endotheliale Funktionsstörung führt zu einer Extravasation hochmolekularer Moleküle und zu intestinalen Ödemen (Vollmar, B., Menger, M.D., 2011). Die Beeinträchtigung der epithelialen Integrität bedingt des Weiteren einen Verlust der mukosalen Barrierefunktion und begünstigt damit die Translokation von intraluminalen Bakterien und Endotoxinen in die Blut- und Lymphbahnen des Darms und kann dadurch zu septischen Komplikationen und letztlich zu einem letalen Ausgang führen (Granger, D.N. et al., 1980; Knichwitz, G. et al., 2005; Vollmar, B., Menger, M.D., 2011). Nichtsdestotrotz ist die ischämische Schädigung ein überwiegend intrazellulär ablaufendes Geschehen und die Reperfusionsschädigung eine eigenständige Pathologie, die umso stärker ausgeprägt ist, je länger die ischämische Phase gedauert hat (de Groot, H., 2005).

Die Reperfusion verursacht eine massive Ausschwemmung von toxischen Substraten, Bakterien und Toxinen (Knichwitz, G. et al., 2005). Dadurch werden weitere Schädigungsprozesse initiiert und die vorhandenen Schäden können sich ausweiten. Dabei spielen die vermehrte Bildung freier Sauerstoffradikale und die inflammatorische Gewebereaktion eine große Rolle (de Groot, H., 2005). Die Reoxygenierung des ischämischen Darms hat zur Folge, dass das in der Ischämie intrazellulär akkumulierte Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure abgebaut werden kann. Der Abbau wird durch die in der Ischämie entstandene Xanthin-Oxidase katalysiert. Als Nebenprodukte des Abbaus von Hypoxanthin entstehen das Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden im Regelfall von zellulären enzymatischen Antioxidantien wie der Superoxiddismutase, der Katalase oder der Glutathionperoxidase reduziert und damit inaktiviert. Allerdings können durch die hohe Belastung der zellulären Antioxidanssysteme während der Reperfusionsphase viele

reaktive Sauerstoffspezies nicht inaktiviert werden. Dieser Umstand hat zur Folge, dass wenig reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vermehrt durch Aktivatoren wie Eisen- oder Kupferionen mittels Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion zu dem extrem reaktiven Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) umgesetzt werden können (Granger, D.N. et al., 1986; Luther, B.L.P., 2001; Mallick, I.H. et al., 2004; de Groot, H., 2005). Das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) ist das am meisten reaktive und kurzlebigste Oxy-Radikal (Schoenberg, M.H., Beger, H.G., 1990). Es reagiert mit allen biologischen Substanzen wie Proteinen, Polysacchariden und Nukleinsäuren und kann sie dadurch schädigen. Des Weiteren greift das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) oft mehrfach ungesättigte Fettsäuren an, wie sie in hohen Konzentrationen in Zellmembranen zu finden sind. Zumeist löst dieser Vorgang die Kettenreaktion der Lipidperoxidation aus. Alle diese Prozesse resultieren in der Desintegration der betroffenen Zellen und können zum Zelltod führen (Schoenberg, M.H., Beger, H.G., 1990; Luther, B.L.P., 2001).

Unabhängig von ihren direkt schädigenden Effekten triggern die reaktiven Sauerstoffspezies die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen und Chemoattraktoren wie dem Komplementfaktor C5a, Zytokinen wie Interleukin-8 (IL-8), Arachidonsäure-Metaboliten wie Leukotrien B_4 (LTB_4) oder dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF) (Cerqueira, N.F. et al., 2005). Diese Vorgänge führen zu einer Adhäsion von polymorphonuklearen Leukozyten, auch *polymorphonuclear neutrophils* (PMN) oder Neutrophile genannt, an das Gefäßendothel. Bei der Leukozyten-Endothel-Interaktion spielen Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Integrin- $\beta 2$, und Immunglobuline wie ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) und VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) eine Rolle. Die Neutrophilen emigrieren aus der Blutbahn in das Darmepithel und die inflammatorische Gewebereaktion, die bei einer *low-flow*-Ischämie teils schon während der Ischämiephase abläuft, nimmt zu (Zimmerman, B.J., Granger, D.N., 1992; Cerqueira, N.F. et al., 2005; Petrat, F. et al., 2012). Aktivierte Neutrophile setzen katalysiert durch verschiedene Enzyme wie die NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat)-Oxidase oder die Myeloperoxidase ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies frei (Simpson, R. et al., 1993). Proinflammatorische Substanzen und Chemoattraktoren locken auch andere Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten an und aktivieren diese, sodass weitere proinflammatorische Substanzen freigesetzt werden (de Groot, H., 2005; Yasuhara, H., 2005). Die Makrophagenaktivierung scheint in einem engen Zusammenhang mit der Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zu stehen und damit ein Grund für die überschießende Stickstoffmonoxid-Bildung während der Reperfusion zu sein (de Groot, H., 2005). Stickstoffmonoxid (NO) reagiert unter anderem mit dem Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) und trägt so zur Bildung von hoch-reaktiven Sauerstoffspezies wie Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$), was unter anderem die mitochondriale Energieproduktion

beeinträchtigt, bei (Fink, M.P., 2003). Dieser Vorgang trägt zum Verlust der Zellintegrität und der Hyperpermeabilität des Mukosaepithels bei (Fink, M.P., 2003). Des Weiteren scheint Stickstoffmonoxid (NO) ein Schlüsselfaktor in der Synthese proinflammatorischer Proteine durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zu sein. Unter anderem reguliert NF- κ B die Expression der oben genannten Adhäsionsmoleküle (Mallick, I.H. et al., 2004). Die Störung der Mikrozirkulation ist ein weiteres zentrales Ereignis der inflammatorischen Gewebereaktion (de Groot, H., 2005). Neutrophile können für mikrovaskuläre Schäden durch die Freisetzung von Proteasen wie der Elastase und der Kollagenase verantwortlich sein. Darüber hinaus kann die Adhäsion der Neutrophilen am Endothel die Kapillaren verstopfen (*capillary plugging*) und so zu einer gestörten Mikrozirkulation führen (Zimmerman, B.J., Granger, D.N., 1992; Simpson, R. et al., 1993; de Groot, H., 2005). Weitere potentielle Auslöser einer gestörten Mikrozirkulation sind eine Störung in der Regulation des kapillären Durchmessers, eine Schwellung der Endothelzellen, interstitielle Ödeme als Folge der Endothelzellschädigung und Zunahme des interstitiellen Drucks, eine intravaskuläre Hämokonzentration als Folge des Flüssigkeitsaustritts ins Gewebe und eine intravaskuläre Thrombusbildung (Menger, M.D. et al., 1992). Auch die gestörte Mikrozirkulation trägt zu der bereits beschriebenen endothelialen Funktionsstörung mit einer Permeabilitäts-erhöhung für Bakterien und Wasser bei, welche wiederum zur Endotoxämie und Bakteriämie führt (Yasuhara, H., 2005).

Letztendlich können die beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge insgesamt ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), ein akutes Lungenversagen (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) und/oder eine kardiale Dysfunktion auslösen und zu einem Multiorganversagen führen (Yasuhara, H., 2005).

1.3.2 Pathomorphologie der intestinalen Ischämie- und Reperfusionsschädigung

Die ischämiebedingten pathophysiologischen Prozesse finden Ausdruck in definierten morphologischen Schädigungsmustern. Es gibt einen zeitlich abgestuften morphologischen Schädigungsablauf der intestinalen Ischämie (s. Tabelle 1, Luther, B.L.P., 2001).

Die ersten elektronenmikroskopisch sichtbaren Schäden sind aufgequollene Endothelzellen und Enterozyten mit geschädigten Zellorganellen, insbesondere den Mitochondrien, und partiell zerstörten Plasmamembranen (Mitsudo, S., Brandt, L.J., 1992). Bereits nach 10-15 Minuten können die ersten Zellen irreversibel geschädigt sein, aber im Regelfall kommt es zur *Restitutio ad integrum* (vollständige Wiederherstellung ohne Defekt). Die irreversible Zellschädigung zeigt sich mikroskopisch in einer blasigen Ablösung oder einem Zerfall der Plasmamembran, einem Totalverlust der Mikrovilli und einer

Karyolyse (Luther, B.L.P., 2001). Im weiteren Verlauf kommt es zu Zottenspitzennekrosen und vereinzelt zu lateralen Epithelablösungen. Gelegentlich sind Läsionen der Basalmembran und der *Lamina propria* sowie geborstene oberflächliche Kapillaren und bedingt dadurch Erythrozyten im Darmlumen zu sehen (Robinson, J.W. et al., 1981; Luther, B.L.P., 2001). Bei anhaltender Ischämie kommt es zu einer Progredienz der Zottennekrosen und zusätzlich zum Auftreten von Kryptenläsionen (Luther, B.L.P., 2001). Des Weiteren treten stärkere Blutungen aus den Kapillaren und Venolen auf. Erhaltene Gefäße sind oft blutgefüllt (Blutstase) oder durch fibrinöse Abscheidungsthromben okkludiert. Ab einer Ischämiedauer von 60-120 Minuten wird die *Tunica muscularis* hypoxisch geschädigt. Auf diese Weise geht die Kontraktilität des Darmrohres und der Gefäßmuskulatur verloren. Bei einer Ischämiedauer von länger als 120 Minuten kommt es zu einer irreversiblen Nekrose aller Darmwandschichten, dem sogenannten transmuralen Darminfarkt (Luther, B.L.P., 2001).

Zeitliche Entwicklung der intestinalen Organnekrose bei kompletter Ischämie und ihre Prognose

Zeit (min)	Morphologische Schädigung	Prognose
5-10	Zellschädigung	Restitutio
10-20	Zottenläsion	Restitutio
20-60	Kryptenläsion	Restitutio/Defektheilung
60-120	Darmwandläsion	Defektheilung/Nekrose
>120	Transmuraler Infarkt	Nekrose

Tabelle 1: Zeitliche Entwicklung der intestinalen Organnekrose bei kompletter Ischämie und ihre Prognose (nach Luther, B.L.P., 2001).

1.4 Glycin

Glycin ist die einfachste aller Aminosäuren und besteht aus einem einzelnen Kohlenstoffmolekül mit einer Amino- und einer Carboxylgruppe (s. Abb. 4; Lee, M.A. et al., 2002; Gundersen, R.Y. et al., 2005). Sie ist als einzige Aminosäure optisch nicht aktiv. Glycin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die von Tieren und Menschen durch verschiedene Enzyme aus Serin, Cholin, Threonin und möglicherweise auch aus Glyoxylat und Hydroxyprolin synthetisiert werden kann (Gundersen, R.Y. et al., 2005; Wang, W. et al., 2013). Glycin wiederum kann in Serin oder Glyoxylat konvertiert werden. Eine weitere Möglichkeit der Katabolisierung von Glycin ist die Decarboxylierung und Deaminierung durch ein Glycin-Spaltungssystem (*glycine cleavage system*, GCS) (Wang, W. et al., 2013).

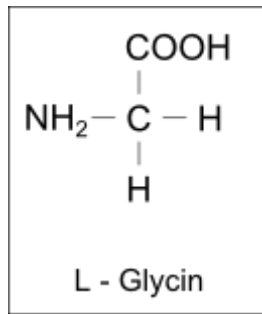


Abbildung 4: Strukturformel von Glycin (nach Kluthe, B., 2014).

In den meisten aller Gewebe von Lebewesen kommt Glycin vor. Glycin macht 11,5% aller Aminosäuren und 20% des Aminosäuren-Stickstoffs in Körperproteinen von Tieren und Menschen aus (Gundersen, R.Y. et al., 2005; Wang, W. et al., 2013). Die Aminosäure Glycin ist eine Schlüsselsubstanz in vielen metabolischen Reaktionen beispielweise im Stoffwechsel von Proteinen, Peptiden, Nukleotiden und Porphyrinen (Gundersen, R.Y. et al., 2005). Des Weiteren ist Glycin ein Bestandteil von Gallensäuren, Kreatinin, Kollagen und dem Antioxidans Glutathion (Petrat, F. et al., 2012; Wang, W. et al., 2013). Darüber hinaus ist Glycin der bedeutendste hemmende Neurotransmitter im adulten zentralen Nervensystem, insbesondere im Hirnstamm und Rückenmark. Durch die Bindung von Glycin an den Glycinrezeptor (GlyR), einen ligandengesteuerten Chloridkanal, kommt es zu einem Chlorideinstrom im postsynaptischen Neuron und so zu einer Membranhyperpolarisation und damit zur Hemmung des Neurons (Gundersen, R.Y. et al., 2005; Petrat, F. et al., 2012). So spielt Glycin eine Rolle bei der Entstehung von Reflexantworten, bei der Verarbeitung von sensorischen Reizen, bei der Wahrnehmung von Schmerz und bei der Regulation von Verhalten, Nahrungsaufnahme und der Ganzkörper-Homöostase (Rajendra, S. et al., 1997; Petrat, F. et al., 2012). Daneben ist Glycin im zentralen Nervensystem auch ein Co-Agonist von Glutamat an den NMDA (*N-Methyl-D-Aspartat*)-Rezeptoren (Wang, W. et al., 2013). Nicht zuletzt wird Glycin als antiinflammatorische, immunmodulative und zytoprotektive Substanz beschrieben (Zhong, Z. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2012).

1.4.1 Glycin als Schutzstoff bei intestinaler Ischämie- und Reperfusionsschädigung

Erstmalig wurde Glycin 1987 durch Weinberg und Kollegen als zytoprotektive Substanz beschrieben. Sie zeigten, dass Glycin Hypoxieschäden an renalen proximalen Tubuluszellen vermindern konnte (Weinberg, J.M. et al., 1987). Danach wurde Glycin erfolgreich als Schutzstoff in verschiedenen Sauerstoff- und Energiemangelsituationen wie der induzierten Ischämie-Reperfusionsschädigung, der Anoxie, der Hypoxie, des oxidativen Stresses durch reaktive Sauerstoffspezies und der chemisch induzierten Hemmung der

zellulären Energiegewinnung eingesetzt. Dies wurde in verschiedenen Versuchsserien mit primären Zellen und Zelllinien, isoliert perfundierten oder ausgelagerten Organen und *in vivo* nachgewiesen (Zhong, Z. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2012). Beispielsweise wurden protektive Effekte von Glycin auf die Ischämie-Reperfusionsschädigung in Leber, Niere und Skelettmuskel sowie im hämorrhagischen Schock nachgewiesen (Marsh, D.C. et al., 1991; Ascher, E. et al., 2001; Yin, M. et al., 2002; Wang, G. et al., 2004). Auch in vielen Modellen zur Untersuchung der Effekte von Glycin auf die intestinale Ischämie- und Reperfusionsschädigung erwies sich Glycin als protektiv (Mangino, J.E. et al., 1996; Iijima, S. et al., 1997; Lee, M.A. et al., 2001; Lee, M.A. et al., 2002; Jacob, T. et al., 2003; Kallakuri, S. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2011). Beispielsweise haben Mangino und Kollegen in einem *in situ*-Perfusionsmodell der intestinalen hypothermen Ischämie- und Reperfusionsschädigung in Hunden gezeigt, dass Glycin die Reoxygenierung verbesserte und den Anstieg der Neutrophileninfiltration in das Darmgewebe sowie die Leukotriensynthese und so die inflammatorische Reaktion verminderte (Mangino, J.E. et al., 1996). Lee und Kollegen haben in einem Ratten-Modell der mesenterialen *low-flow*-Ischämie und Reperfusion gezeigt, dass die lokale Perfusion mit Glycin die intestinale Ischämie-Reperfusionsschädigung verminderte. Glycin steigerte den mukosalen Protein- und DNA-Gehalt, als Maß für die zelluläre Integrität, reduzierte die intestinale Myeloperoxidase-Aktivität, als Maß der Inhibierung der inflammatorischen Reaktion, und erhielt die Glutaminaseaktivität der Mukosa, als Maß der funktionellen Beeinträchtigung der Enterozyten, aufrecht (Lee, M.A. et al., 2001).

Die protektiven Wirkmechanismen von Glycin sind nicht endgültig geklärt. Generell wird akzeptiert, dass für die direkte Zytoprotektion durch Glycin die Anwesenheit der Aminosäure erforderlich ist, aber der Schutz nicht abhängig ist von ihrem Metabolismus, von der Proteinsynthese, von Veränderungen im zytosolischen Calciumspiegel oder von der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes oder des Glutathion (GSH)-Pools und dass Glycin nicht die ATP-Herstellung unterstützt oder den Energieverbrauch vermindert (Zhong, Z. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2012). Vorgeschlagene Mechanismen der Zytoprotektion durch Glycin sind unter anderem eine antioxidative Wirkung sowie das Verhindern der Aktivierung von Neutrophilen durch die Inhibierung von Glycin-gesteuerten Chloridkanälen und dadurch eine Hemmung der inflammatorischen Reaktion (Lee, M.A. et al., 2002; Zhong, Z. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2012). Auch scheint die Modulation von apoptotischen Signalen durch Glycin eine Rolle zu spielen (Jacob, T. et al., 2003). Als weiterer Mechanismus des Schutzeffektes von Glycin wird das Verhindern der Bildung von Plasmamembranporen und damit die Blockade einer gesteigerten Plasmamembranpermeabilität diskutiert (Venkatachalam, M.A. et al., 1996; Petrat, F. et al., 2012). Die Mechanismen der Glycinschutzwirkung werden weiterführend in Kapitel 4.4 diskutiert.

1.5 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Wie bereits in Kapitel 1.1 dargestellt wurde, ist das Krankheitsbild der akuten mesenterialen Ischämie mit einer hohen Mortalität assoziiert und nur eine frühzeitige Diagnosestellung und eine zügige Therapie können den tödlichen Ausgang verhindern (Berland, T., Oldenburg, W.A., 2008; Ellis, J., Sarac, T.P., 2010; Bobadilla, J.L., 2013; Sise, M.J., 2014). Die enorm hohe Morbidität und Mortalität im Spätstadium des Krankheitsverlaufes, in welchem meist erst die richtige Diagnose gestellt wird, ist für Ärzte und Patienten unbefriedigend. Da die Diagnosestellung meist (zu) spät erfolgt, müsste eine optimale Therapieoption den Verlauf der Krankheit selbst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium positiv beeinflussen können. Es wird an vielen verschiedenen potentiellen Therapieoptionen geforscht. Ein experimenteller Therapieansatz ist die Gabe von Glycin. In vielen Tierexperimenten wurde das protektive Potential von Glycin auf die mesenteriale Ischämie- und Reperfusionsschädigung nachgewiesen (s. Kapitel 1.4.1). Bei den weit meisten *in vivo*-Experimenten zur Untersuchung des protektiven Potentials von Glycin auf die mesenteriale Ischämie- und Reperfusionsschädigung wurde die mesenteriale Ischämie durch Okkludierung der *Arteria mesenterica superior* induziert (Iijima, S. et al., 1997; Jacob, T. et al., 2003; Kallakuri, S. et al., 2003; Petrat, F. et al., 2011). Das bedeutet, dass in diesen Experimenten aufgrund bestehender Kollateralkreisläufe eine *low-flow*-Ischämie induziert wurde (s. Kapitel 1.2.1). Bisher wurde nicht untersucht, ob und wie Glycin in einem *in vivo*-Modell der absoluten/*no-flow*-Ischämie vor der Ischämie- und/oder Reperfusionsschädigung des Darms schützt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist dies herauszufinden. Diese Fragestellung ist von Interesse, da angenommen wird, dass in einem Modell der *no-flow*-Ischämie im Vergleich zu einem *low-flow*-Ischämie-Modell andere Schädigungsmechanismen von Bedeutung sind (Petrat, F. et al., 2012). Das bedeutet auch, dass somit andere Schutzmechanismen von Glycin eine Rolle spielen könnten. Um diese Fragen untersuchen zu können, muss zunächst ein Modell etabliert werden, dass eine absolute mesenteriale Ischämie durch Ausschaltung aller Kollateralkreisläufe sicherstellt (s. Kapitel 2.2.4.3). Nach der Etablierung eines Modells der absoluten Ischämie soll der Einfluss von Glycin auf hämodynamische und systemische Parameter sowie solche der Gewebeschädigung untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen bei der Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Glycin in der akuten mesenterialen Ischämie und Reperfusion helfen, um für die Zukunft weitere Therapieansätze für dieses lebensbedrohliche Krankheitsbild erforschen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pharmaka und Chemikalien

Hersteller	Produkt
Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland	Forene® (Isofluran)
Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland	Sauerstoff
AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland	Xylocain® 1% (Lidocain)
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	<i>Aqua ad iniectionabilia</i> (H ₂ O), Isotone Kochsalzlösung 0,9% (NaCl)
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S), Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁), Ethanol (C ₂ H ₆ O), Salzsäure (HCl)
Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland	Ketamin 10%
DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland	ALAT FS (IFCC mod.), ASAT FS (IFCC mod.), LDH FS (IFCC)
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Complete® Proteaseinhibitorcocktail
Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland	Freeflex® (Ringerlösung)
McCormick Scientific, St. Louis, USA	Paraffin
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), Natriumhydroxid (NaOH)
Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande	Ethylendiamintetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Glycin (analytical grade)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Formalin (10%, neutral gepuffert), o-Dianisidin, Butylhydroxytoluol (C ₁₅ H ₂₄ O)

Tabelle 2: Pharmaka und Chemikalien.

2.1.2 Hilfsmittel und Geräte

Hersteller	Produkt
Asmuth GmbH, Minden, Deutschland	Medizinische Temperatursonde D-RB3
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland	Ultraschallwärmebad Sonorex RK100
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Perfusor® Secura FT, Perfusor®-Spritze 50 ml, Perfusor®-Leitung, Schüttler Certomat® U
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	BD Microlance™ 3-Injektionskanülen (blau, 23G x 1 ¼“, 0,6 x 30 mm; gelb, 30G x ½“, 0,3 x 13 mm)
Biotronik SE & Co. KG, Berlin, Deutschland	Aminosäuren-Analysegerät (Biotronic LC 3000)
BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland	Wasserkochtopf 1200 Watt
Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland	Canon 1000 D Digitalfotoapparat
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Objektträger Polysine™
Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland	Lichtmikroskop Zeiss KF2
Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland	Narkosegerät Trajan 800
Düwi® GmbH, Breckersfeld, Deutschland	Wärmelampe 50 Watt

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Eppendorf-Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)
Feinmechanische Werkstatt des Universitätsklinikums Essen, Essen, Deutschland	Tischkonstruktion zur Auslagerung des Rattendünndarms
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Sensor Comfort Pro), Teststreifen Accu-Chek Compact Glucose
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland	Arterienknopfschere (11,5 cm), Bulldog-Arterienklemmen (26 mm, gewinkelt, atraumatisch), Chirurgische Standardschere (13 cm), Chirurgische und anatomische Standardpinzetten (12 bis 17 cm), Graefe-Pinzetten (10 cm und 14 cm, gekrümmt), Halsted Mosquitoklemme (8 cm, gekrümmt)
Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland	Präzisionsküvette aus Quarzglas (Suprasil®, 105.200-QS)
Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland	Zentrifuge (Biofuge primo), Trockenschrank B6760
Karl Beese GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland	Bee Sana® (Vliesstoffkompressen)
Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland	Feinwaage 770
LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Deutschland	Laserdoppler-Flowmeter O2C
Leica, Wetzlar, Deutschland	Rotationsmikrotom RM2235, OP-Lampe (Leica KL 1500 LCD)
MaiMed GmbH, Neukirchen Deutschland	Wattestäbchen (MaiMed®-Tip)
Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland	Beheizbarer Kleintier-OP-Tisch (Wärmeplatte Typ 13511)
Medex Medical Ltd, Rossendale, Großbritannien	Druckwandler logical MX960

mediPlac GmbH, Borchen, Deutschland	Druckmanschette
Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	Paraffin-Einbettssystem TBS 88
Midmark Corporation, Versailles, USA	Matrx Anesthetic Gas Scavenger
Nellcor™, Boulder, USA	Pulsoximeter OxiCliq A
neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland	Eisbad, groß
Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland	Peha-soft <i>powderfree</i> (Einweghandschuhe)
Peter Oehmen GmbH, Essen, Deutschland	Thermostatisches Wasserbad SUB6
Radiometer GmbH, Willich, Deutschland	Blutgasanalysegerät ABL 715, Trockenheparin-Spritze PICO 50
Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland	Nahtmaterial (nicht resorbierbar, geflochten, 4/0 USP, 1.5 metric)
Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland	Schwingmühle MM200
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	SafeSeal-Reagiergefäße (1 ml, 1,5 ml, 2 ml), Falcons (15 ml, 50 ml), Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Messküvetten (10 x 4 x 45 mm), Petrischalen (35 x 10 mm)
Shirley Aldred & Co. LTD, Sheffield, Großbritannien	Adsorber Cardiff Aldasorber
Siemens, Essen, Deutschland	Biomonitor Sirecust 1260
Smiths Medical GmbH, Glasbrunn, Deutschland	Portex™ Polyethylen-Schläuche (0,58 mm ID, 0,96 mm OD), 3-Wege Hähne

Terumo Europe, Leuven, Belgien	Kolbenspritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml)
Varian Medical Systems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland	Cary 100 Scan Spectrophotometer
VWR International, Darmstadt, Deutschland	Vitalab Selectra E
WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland	pH-Meter inoLab Level 1

Tabelle 3: Hilfsmittel und Geräte.

2.2 Methoden

2.2.1 Die Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Ratten vom Stamm Wistar (WIS (WU)). Das Einschlusskriterium war ein Körpergewicht zwischen 400 g und 470 g. Die Zucht und Haltung erfolgte bei konstanter Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), konstanter relativer Luftfeuchtigkeit ($55\% \pm 5\%$) und 12/12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus durch das zentrale Tierlabor des Universitätsklinikum Essen (Essen, Deutschland) und die Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland). Standardfutter (ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser stand den Versuchstieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung erfolgte entsprechend den geltenden Tierschutzgesetzen. Die hier beschriebenen Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (TSG(TierSchutzGesetz)-Nr.: G 1046/09).

2.2.2 Aufbau der Versuchsserien

Es wurden Vorversuche und zwei unterschiedliche Versuchsserien durchgeführt. Abbildung 5 zeigt den zeitlichen Ablauf der Hauptversuchsserie (Serie 1). Der Versuchsaufbau dieser Serie bestand aus zwei oder drei Phasen: Vorlauf, Ischämie und gegebenenfalls Reperfusion. Die Phase des Vorlaufs beinhaltete die Anästhesierung und Analgesierung des Versuchstieres und die Katheterisierung der Femoralgefäße (s. Kapitel 2.2.4.1/2). Direkt nach der Kathetereinlage in die *A. femoralis* erfolgte die erste Blutabnahme (Zeitpunkt 1, nach 10 Minuten). Nach der Katheterisierung der *V. femoralis* wurde mit der Infusion der jeweiligen Lösungen (0,9%ige Kochsalzlösung oder die potentielle Schutzlösung aus 0,9%iger Kochsalzlösung mit $20\text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ Glycin, s. Kapitel 2.2.3) begonnen. Die Infusion wurde für insgesamt 90 oder 215 Minuten

(30 Minuten Vorlauf-/Ischämie-Induktionsphase + 60 Minuten Ischämiephase + gegebenenfalls 5 Minuten Reperfusion-Induktionsphase und 120 Minuten Reperfusionsphase) fortgeführt. Die aufwendige Induktion der segmentalen Ischämie von drei Dünndarmsegmente (s. Kapitel 2.2.4.3) beanspruchte ein circa 10-minütiges Zeitfenster. Nach einer Infusionsdauer von 30 Minuten fand die zweite Blutabnahme direkt vor der Okkludierung der Gefäße durch atraumatische Bulldog-Arterienklemmen und somit direkt vor Beginn der Ischämiephase statt (Zeitpunkt 2, nach 40 Minuten). Die Ischämie der drei Dünndarmsegmente wurde über 60 Minuten aufrechterhalten. An diese 60-minütige Ischämie-Phase schloss sich die dritte Blutabnahme an (Zeitpunkt 3, nach 100 Minuten). Je nach Versuchsgruppe wurde dann der Versuch beendet oder es folgte eine Reperfusionsphase von 120 Minuten. Die Induktion der Reperfusion durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen an allen drei Dünndarmsegmenten dauerte circa 5 Minuten. Nach einer Reperfusionsdauer von 5 Minuten erfolgte die vierte Blutentnahme (Zeitpunkt 4, nach 110 Minuten). Die finale fünfte Blutabnahme fand nach 120 Minuten Reperfusion statt (Zeitpunkt 5, nach 225 Minuten). Im Anschluss an die Versuche folgte die Euthanasie der Versuchstiere.

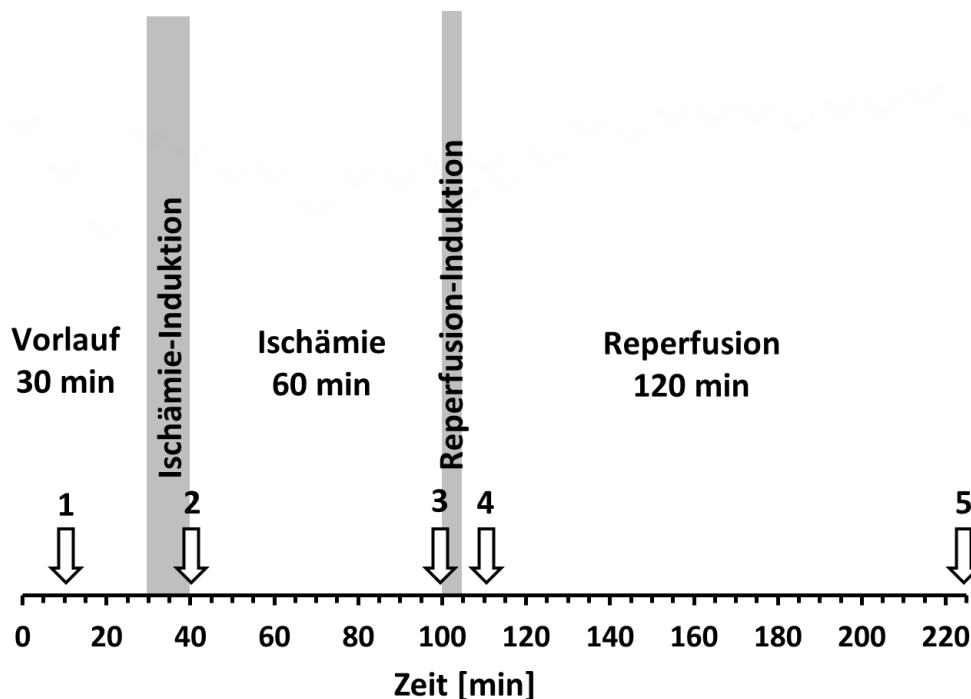


Abbildung 5: Zeitlicher Versuchsablauf der Hauptversuchsserie (Serie 1).

Die Versuche der Serie 1 begannen mit einer 30-minütigen Vorlaufphase, in welcher die Kathetereinlagen stattfanden. Dann folgte die Ischämie-Induktion, die circa 10 Minuten dauerte. Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. In bestimmten Versuchsgruppen schloss sich eine 120-minütige Reperfusionsphase an, deren Induktion circa 5 Minuten dauerte.

Die Pfeile deuten auf die Zeitpunkte der Blutentnahmen (Zeitpunkte der Blutentnahmen: 1 = direkt nach Arterienkathetereinlage, 2 = vor Ischämiebeginn, 3 = nach 60 min Ischämie, 4 = nach 5 min Reperfusion, 5 = nach 120 min Reperfusion).

Der Versuchsaufbau der Versuchsserie 2 ähnelte dem Aufbau der Hauptversuchsserie und bestand aus 30 Minuten Vorlauf, 10 Minuten Ischämie-Induktion und 10 Minuten Ischämie. Ebenfalls wurde vor Beginn der Ischämiephase über 30 Minuten 0,9%ige Kochsalzlösung oder die potentielle Schutzlösung aus 0,9%iger Kochsalzlösung mit 20 mg/kg KGW x h⁻¹ Glycin (s. Kapitel 2.2.3) infundiert. Der Unterschied zur Hauptversuchsserie bestand darin, dass sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt" wurden, sodass definitiv keine Blutversorgung der drei Dünndarmsegmente bestand (s. Kapitel 2.2.4.3). Während der Ischämie-Phase wurden die Mikrozirkulationsparameter nach 5 und 10 Minuten dokumentiert. Es fand nur eine Blutabnahme nach der Arterienkathetereinlage (Zeitpunkt 1, nach 10 Minuten) statt.

2.2.3 Die Versuchsgruppen

Hauptversuchsserie (Serie 1)		
Gruppe	Perfusion mit	Anzahl der Tiere
Normoxie	5,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung	4
I, Kontrolle	5,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung	8
I, Glycin	7,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung mit 20 mg/kg KGW x h ⁻¹ Glycin	7
I/R, Kontrolle	5,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung	8
I/R, Glycin	7,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung mit 20 mg/kg KGW x h ⁻¹ Glycin	7
Serie 2		
I, Kontrolle	7,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung	6
I, Glycin	7,0 ml/kg KGW x h ⁻¹ NaCl-Lösung mit 20 mg/kg KGW x h ⁻¹ Glycin	6

Tabelle 4: Charakterisierung der Versuchsgruppen.

I: Ischämie, I/R: Ischämie/Reperfusion, NaCl: isotonische 0,9%ige Kochsalzlösung.

In der Hauptversuchsserie (Serie 1) wurden fünf Versuchsgruppen miteinander verglichen (s. Tabelle 4). Bei den Versuchstieren der Gruppe „Normoxie“ wurde der Versuch äquivalent zu den anderen Versuchsgruppen mit Ausnahme der Ischämieinduktion durchgeführt (s. Kapitel 2.2.4.3). Diese Gruppe diente der Charakterisierung der von der mesenterialen Ischämie/Reperfusion unabhängigen Veränderungen aller Parameter im Zeitverlauf des Versuches. Mit Hilfe der Versuchsgruppen „I, Kontrolle“ und „I/R, Kontrolle“ konnten die Auswirkungen der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion auf hämodynamische und systemische Parameter sowie auf Gewebeschädigungsparameter

festgestellt werden. Die Effekte auf die hämodynamischen und systemischen Parameter sowie auf solche der Gewebeschädigung durch die zusätzliche Glycingabe wurden in den Versuchsgruppen „I, Glycin“ und „I/R, Glycin“ untersucht. In Serie 2 wurden eine Glycin-Gruppe und eine Kontroll-Gruppe mit äquivalenter Volumenzufuhr miteinander verglichen. Die Dosierung von Glycin ($20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$) wurde angelehnt an die Versuchsergebnisse einer Versuchsreihe zur Dosisfindung von Glycin als potentielle Schutzlösung in einem Rattenmodell der mesenterialen *low-flow*-Ischämie und Reperfusion (Petrat, F. et al., 2011). Insgesamt wurde den Versuchstieren in den Glycin-Gruppen der Hauptversuchsserie 30 mg/kg KGW (ohne Reperfusionsphase) oder circa 70 mg/kg KGW Glycin ($71,67 \text{ mg/kg KGW}$, mit Reperfusionsphase) appliziert. In Serie 2 wurde den Tieren insgesamt 10 mg/kg KGW Glycin appliziert.

2.2.4 Das Tiermodell: Anästhesie und operative Eingriffe

2.2.4.1 Anästhesie und Analgesie

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Begasungstopf mit 2% Isofluran in 100% Sauerstoff bei einem Fluss von $4,0 \text{ l/min}$. Es wurde abgewartet bis das Versuchstier das Bewusstsein verloren hat und die Sedierung ausreichend war (Erlöschen des Zwischenzehen- und Kornealreflexes). Dann wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch, der mit einer Unterlage (Aluminium- und Frischhaltefolie) zur Vermeidung der Auskühlung und Austrocknung des Versuchstieres ausgelegt war, umgelagert und an eine Narkosemaske mit 1,5% Isofluran in 100% Sauerstoff bei einem Fluss $1,0 \text{ l/min}$ angelegt. Zur Analgesie wurde den Versuchstieren 50 mg/kg KGW Ketamin subkutan in die rechte Flanke injiziert. Außerdem wurde den Versuchstieren zur Lokalanästhesie des Operationsgebietes für die Anlage der Femoralgefäßkatheter 5 mg/kg KGW Lidocain subkutan in die rechte Leistenregion injiziert.

2.2.4.2 Katheterisierung der Femoralgefäße

Nach Überprüfung der vollständigen Analgesie des Operationsgebietes durch Setzen eines Schmerzreizes im Operationsgebiet erfolgte die Eröffnung des Operationsgebietes mittels eines etwa $1,5$ bis 2 cm langen Hautschnittes. Es folgte eine möglichst stumpfe und atraumatische Präparation des Operationsgebietes mit Hilfe von Wattestäbchen. Danach wurden die Femoralarterie und -vene vom umliegenden Gewebe befreit und voneinander separiert. Zuerst wurde die *A. femoralis* auf die Branchen einer Pinzette aufgelagert und es erfolgte eine Umschlingung (offene Ligatur) nach kranial und eine Ligatur nach kaudal, jeweils mit Nahtmaterial aus Seide. In die *A. femoralis* wurde mit einer Arterienknopfschere eine etwa $1 \times 1 \text{ mm}$ große Inzision geschnitten. Anschließend wurde ein mit Ringerlösung

gefüllter Polyäthylen-Schlauch als Katheter eingelegt. Das eine Ende des Katheters wurde mit der nach kranial gesetzten Ligatur im Gefäß und mit der nach kaudal gelegten Ligatur am Gefäß fixiert. Das andere Ende des Katheters wurde an eine Kanüle gesteckt, die wiederum an einen Dreiwegehahn angeschraubt wurde. Diese arterielle Katheterisierung konnte dann zur invasiven Blutdruckmessung und für Blutabnahmen genutzt werden. Nach dem gleichen Prinzip erfolgte eine Katheterisierung der *V. femoralis* (s. Kapitel 2.2.4.3, Abb. 6b). Der *V. femoralis*-Katheter diente der Infusion von 0,9%iger Kochsalzlösung und in bestimmten Versuchsaufbauten zusätzlich der Infusion von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ Glycin (s. Kapitel 2.2.3, Tabelle 4; Glycin frisch gelöst in 14 ml 0,9%iger Kochsalzlösung und pH-adjustiert auf 7,35 mit 1 N Natronlauge). Um eine Austrocknung des Operationsgebietes zu vermeiden, wurde das Operationsgebiet mit mehreren Vliesstoffkompressen, die mit 0,9%iger Kochsalzlösung getränkt waren, abgedeckt.

2.2.4.3 Induktion von segmentaler absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms

Zur Sicherstellung der absoluten/*no-flow*-Ischämie wurde ein Modell der segmentalen Ischämie gewählt, um eine Versorgung über Kollateralkreisläufe auszuschließen (s. Kapitel 1.2.1). Zunächst wurde der Bauchraum durch eine mediane Laparotomie entlang der *Linea alba* eröffnet. Anschließend wurde der gesamte Dünndarm mitsamt dem Mesenterium auf eine mit Frischhaltefolie ausgelegte Tischkonstruktion (Feinmechanische Werkstatt des Universitätsklinikums Essen, Essen, Deutschland) ausgelagert. Der Dünndarm wurde vorsichtig ausgebreitet, sodass er in seiner Gesamtheit und in seinem Verlauf sichtbar wurde. Während des Versuchszeitraumes, wenn keine Manipulationen am Dünndarm erforderlich waren, wurde der Darm mit einer Frischhaltefolie abgedeckt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Zu Beginn der Ischämieinduktion wurde der gesamte Dünndarm visuell in zehn gleich große Segmente unterteilt. Danach wurden zwei minimal versetzte Ligaturen je kranial und kaudal der Segmente 3, 6 und 9 gesetzt, das heißt zwischen den benachbarten Segmenten wurde sowohl der Blutfluss durch die Darmwand als auch der Transport von Ingesta durch das Darmlumen vollständig unterbunden. An den Segmentenden zwischen den Ligaturen wurden die circa 10 cm langen Segmente zusätzlich durch Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert, um das Netzwerk von kommunizierenden submukosalen Gefäßen sicher auszuschalten (s. Kapitel 1.2.1). So konnte sichergestellt werden, dass nur noch die sichtbaren mesenterialen Gefäße zur Blutversorgung des jeweiligen Segments beitragen konnten. In der ersten Versuchsserie (Serie 1) erfolgte die Ischämie-Induktion der Segmente 3, 6 und 9 durch die Abklemmung der drei bis vier sie versorgenden mesenterialen Gefäße mit Hilfe

von atraumatischen Bulldog-Arterienklemmen (s. Abb. 6c). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperfusionsphase von 120 Minuten an (s. Kapitel 2.2.3), indem die Arterienklemmen vorsichtig entfernt wurden. In der zweiten Versuchsserie (Serie 2) wurden nach dem Absetzen der Dünndarmsegmente die mesenterialen Gefäße ebenfalls durchtrennt. Das bedeutet, dass die Dünndarmsegmente vollständig vom Tier isoliert wurden, sodass definitiv keine Blutversorgung der drei Segmente bestehen konnte (s. Abb. 6d). Die Beobachtungsdauer der isolierten und somit ischämischen Segmente betrug 10 Minuten. In beiden Versuchsserien (Serie 1 und 2) wurde der Darm mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet, wenn am Darm manipuliert wurde, um eine Austrocknung zu vermeiden. Des Weiteren wurde der Darm mit einer Wärmelampe bestrahlt, um seine Auskühlung zu verhindern und die Körpertemperatur trotz Exteriorisierung des Dünndarms aufrecht zu halten. Die Temperatur wurde mit einem Temperatursensor überwacht.

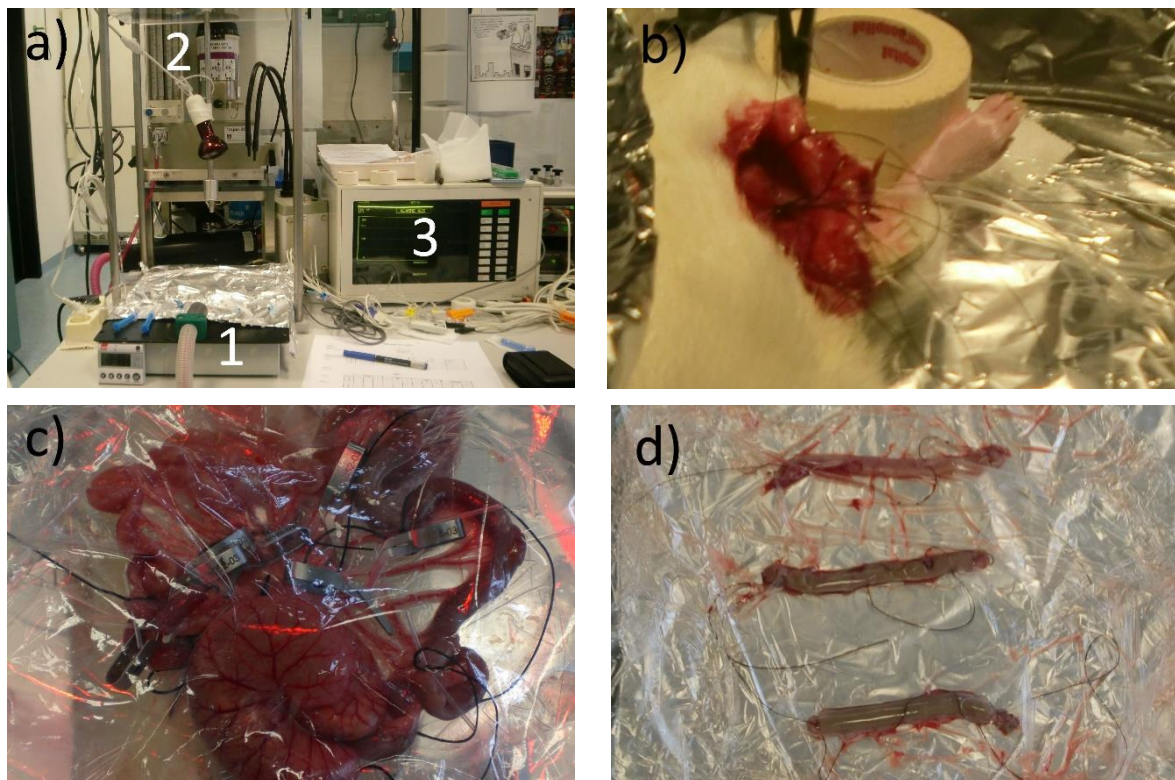


Abbildung 6: Arbeitsplatz und Versuchsaufbauten.

a) Operationsarbeitsplatz: beheizbarer Kleintier-OP-Tisch (1), Narkosegerät (2), Biomonitor (3); b) katheterisierte Femoralgefäße; c) segmentale Ischämie durch Minibulldog-Klemmen in der Hauptversuchsserie (Serie 1); d) segmentale Ischämie durch komplette Entnahme der Dünndarmsegmente (Serie 2).

2.2.4.4 Dünndarmentnahme und Euthanasie der Tiere

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Narkose durch eine Erhöhung der Isoflurankonzentration von 1,0-1,6% auf 4% in 100% Sauerstoff bei einem Fluss von 1,0 l/min vertieft. Unter dieser tiefen Narkose erfolgte die Dünndarmentnahme, indem der Dünndarm proximal am Magen und distal am Blinddarm abgesetzt wurde. Danach erfolgte eine Brustraumeröffnung mit einer Schere, um die Versuchstiere durch eine kardiale Inzision zu töten.

2.2.5 Das Tiermodell: Monitoring und Blutuntersuchungen

2.2.5.1 Biomonitoring der Vitalparameter

Das nicht-invasive Biomonitoring wurde bereits vor der Katheterisierung der Femoralgefäße begonnen. Nach Anlegen der Versuchstiere an die Narkosemaske wurde den Tieren rektal eine Temperatursonde zur Messung der Körpertemperatur eingeführt. Im Versuchsaufbau wurde die Körpertemperatur zwischen 36,0 °C und 38,0 °C gehalten. Eine Regulation konnte über den beheizbaren Kleintier-OP-Tisch vorgenommen werden. Des Weiteren wurde zu diesem Zeitpunkt ein Pulsoximeter zur kontinuierlichen Messung der Sauerstoffsättigung im Blut an einer Hinterpfote der Versuchstiere befestigt. Die Atemfrequenz der Versuchstiere wurde mittels visueller Zählung der Atembewegungen ermittelt. Sie diente als ein Anhaltspunkt für die Narkosetiefe und wurde hinsichtlich der Narkoseführung berücksichtigt. Die Narkosetiefe wurde im Versuchsverlauf der Reaktion auf Schmerzreize, der Höhe der Atemfrequenz und dem mittleren arteriellen Blutdruck mittels einer Regulierung der Isoflurankonzentration zwischen 1,0% und 1,6% in 100% Sauerstoff bei einem Fluss von 1,0 l/min angepasst. Die invasive Messung des Blutdruckes über die *A. femoralis* erfolgte über ein System aus Ringerlösung, Druckmanschette und Druckwandler, der mit dem Biomonitor verbunden war. Im Versuchsaufbau wurden mittlere arterielle Drücke zwischen 80 mmHg und 110 mmHg toleriert. Wenn der systolische Blutdruck über eine Dauer von 5 Minuten auf unter 90 mmHg gefallen war, wurde ein Volumenbolus von 0,5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung über den *A. femoralis*-Katheter verabreicht. Die Gabe von Boli wurde bis zu einem maximalen Volumen von 5 ml/kg x h⁻¹ wiederholt. Bei zu hohen mittleren arteriellen Blutdrücken wurde die Narkosetiefe durch eine Steigerung der Isoflurankonzentration erhöht. Die Herzfrequenz wurde anhand der Blutdruckkurve auf dem Biomonitor durch Abzählen der systolischen Blutdruck-Spitzen ermittelt. Alle Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur, Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und die Isoflurankonzentration in der Narkosegaszufuhr) wurden alle 10 Minuten dokumentiert. In Versuchsserie 2 wurden die

Parameter nur im Vorlauf dokumentiert, da für die Ischämiephase der entnommenen Dünndarmsegmente die Vitalparameter der Versuchstiere keine Rolle mehr spielten (s. Kapitel 2.2.2).

2.2.5.2 Monitoring der Mikrozirkulationsparameter des Dünndarms

Die Parameter der Mikrozirkulation in der Dünndarmwand der drei separierten Segmente wurden während des Versuches mittels des Laserdoppler-Flowmeters O2C (*Oxygen to see*, LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Deutschland) erfasst. Dies geschah mit Hilfe eines Messkanals mit einer Glasfasermesssonde, die mit einer Laser-Doppler-Messeinheit und einer Gewebespektrometrie-Einheit mit Weißlichtquelle verbunden war. Die Messsonde wurde unter Vermeidung einer Gewebekompression unter der Mitte des jeweiligen Segments (unter der äußeren Darmwand) platziert. Es wurde einige Sekunden auf die Einpendlung der Messwerte gewartet und anschließend wurden Werte aus einem Messintervall von circa 10 Sekunden aufgenommen. Ein aus diesen Messwerten gemittelter Wert wurde dokumentiert. Die Parameter „Sauerstoffsättigung des Hämoglobins des Blutes“ (in %), „relative Hämoglobinmenge“ und „Blutfluss“ (*flow*) (jeweils in gerätespezifischen, relativen Einheiten (*Arbitrary Unit*, AU)) wurden im 10-Minutentakt dokumentiert. In der zweiten Versuchsserie wurden sie im 5-Minutentakt dokumentiert.

2.2.5.3 Blutentnahme, Blutgasanalyse und Bestimmung von Parametern im Blutplasma

Zu definierten Zeitpunkten wurden den Versuchstieren in der Hauptversuchsserie je nach Versuchsgruppe insgesamt drei oder fünf Mal arterielles Blut über den Katheter in der *A. femoralis* abgenommen (s. Kapitel 2.2.2, Abb. 5). Bei jedem Zeitpunkt wurde den Versuchstieren aufgeteilt auf zwei Spritzen 700 µl Blut abgenommen. Mit einer 2 ml Trockenheparin-Spritze (PICO 50, Radiometer, Willich, Deutschland), die 80 IU elektrolytkompensiertes Heparin enthielt, wurde den Versuchstieren 400 µl Blut abgenommen. Ein kleiner Teil dieses Volumens wurde bei den Zeitpunkten 1, 3 und 5 (1 = direkt nach Arterienkathetereinlage, 3 = nach 60 min Ischämie, 5 = nach 120 min Reperfusion) für Blutgasanalysen mit Hilfe des Blutgasanalysegerätes ABL 715 Series (Radiometer, Willich, Deutschland) genutzt. Bei den Blutgasanalysen wurden Parameter des Säure-Base-Haushaltes (pH-Wert, arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdrücke (pO_2 , pCO_2), Sauerstoffsättigung (sO_2), *Base Excess* (BE), Standardbikarbonat (HCO_3^-)), Parameter eines kleinen Blutbildes (Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hct)), Parameter des Elektrolythaushaltes (Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}), Chlorid (Cl^-)), metabolische Parameter (Glucose (Glu), Lactat (Lac)) und

die Osmolarität (mOsm) gemessen. Das restliche (bei den Zeitpunkten 1, 3 und 5) beziehungsweise ganze (bei den Zeitpunkten 2 und 4) Volumen dieser 400 µl Blutproben wurde zur Plasmagewinnung zentrifugiert (3000 x g für 15 Minuten). Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und für maximal vier Stunden bei 4 °C gelagert. Im Plasma wurden mit Hilfe eines automatischen Analysegerätes (Vitalab Selectra E, VWR International, Darmstadt, Deutschland) die Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH), der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der Alanin-Aminotransferase (ALAT) bestimmt. Des Weiteren wurde den Versuchstieren zum Zeitpunkt jeder Blutabnahme über eine 1 ml Insulin-Spritze, die 0,48 mg Ethylendiamintetraessigsäure enthielt, 300 µl Blut zur Aminosäurenspiegel-Bestimmung abgenommen. Diese Proben wurden ebenfalls zur Plasmagewinnung zentrifugiert (3000 x g für 15 Minuten). Danach wurden die Plasma-proben bei -70 °C tiefgefroren. Die weitere Analyse erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Barbara Finckh am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Mit Hilfe eines Aminosäuren-Analysegerätes (Biotronic LC 3000, Biotronik SE & Co. KG, Berlin, Deutschland) gemäß Standardmethode (Laborservice Onken, Gründau, Deutschland) sind die Spiegel der folgenden Aminosäuren gemessen worden: Alanin, Arginin, Aspargin, Asparaginsäure, Citrullin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin und Valin. Alle Aminosäuren wurden aus einem Kationenaustauscherharz durch den Gebrauch von Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken eluiert. Der Nachweis der Aminosäuren erfolgte nach einer Ninhydrinsäulenderivatisierung bei 570 nm. Das Gesamtvolumen der Blutentnahme wurde zu jedem Zeitpunkt äquivalent durch 700 µl 0,9%ige Kochsalzlösung substituiert.

In Serie 2 erfolgte nur eine Blutgasanalyse nach der Arterienkathetereinlage und keine Bestimmung der Plasmaenzymaktivitäten und Aminosäurenspiegel. Die systemischen Parameter der Tiere waren nur kurzzeitig in der Vorlaufphase des Versuchsaufbaues von Relevanz, da in der Ischämie die Dünndarmsegmente vollständig von den Versuchstieren isoliert waren.

2.2.6 Gewebeschädigungsparameter des Dünndarms

2.2.6.1 Bestimmung des Dünndarmgewichts

Unmittelbar nach seiner Entnahme wurde der gesamte Dünndarm, also die (post-) ischämischen Segmente zuzüglich der übrigen Segmente, gewogen, um das Verhältnis von Dünndarmgewicht zum Körpergewicht des Versuchstieres (g/kg KGW) berechnen zu können. Dieses Verhältnis ist ein Maß für den gesamten Flüssigkeitsgehalt des Darms, also der (nicht resorbierten) Flüssigkeit im Darmlumen und den Gewebeödemen in der

Darmwand. Dieser Parameter wurde nicht in Serie 2 bestimmt, da die Dünndarmsegmente von den Versuchstieren vollständig isoliert worden waren. Im Anschluss an die Wägung wurden die drei (post-) ischämischen Segmente (mit Ligaturen und Darminhalt) getrennt voneinander in Petrischalen mit eisgekühltem Puffer (4 °C, 140 mM NaCl, 20 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, pH 7,4) überführt.

2.2.6.2 Bestimmung der Längenänderung der Dünndarmsegmente durch Gewichte

Der Parameter der Längenänderung der Dünndarmsegmente durch Gewichte wurde als Maß für die Schädigung der Muskelschicht der Darmwand (*Tunica muscularis*) bestimmt. Nach dem Dokumentieren der Ausgangslänge (Länge zwischen den Ligaturen) wurden für alle drei Dünndarmsegmente Längenänderungen durch angehängte, exponentiell zunehmende Gewichte (1,15 g, 3,46 g und 9,68 g) bestimmt. Die Gewichte entsprechen einer Konstruktion aus zwei Bulldog-Arterienklemmen (1,15 g) und einem 1-Cent Stück (3,46 g) oder einem 2-Euro-Stück (9,68 g). Die These zur Interpretation dieses Assays ist, dass je kleiner die prozentuale Längenzunahme durch die Gewichte ist, desto weniger die *Tunica muscularis* geschädigt ist. Weiterführend wird diese These in Kapitel 4.2 diskutiert. Anschließend an die Messung mit den Gewichten wurde nochmals die Länge der Darmsegmente ohne Gewichte bestimmt. Die Ergebnisse des Assays werden als prozentuale Längenzunahme der Ausgangslängen dargestellt.

2.2.6.3 Bestimmung des Nass-Trockengewichts

Als selektives Maß für die Gewebeödeme der Darmwand wurde die prozentuale Gewichtsdifferenz zwischen Nass- und Trockengewicht bestimmt. Aus der Mitte der drei Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 wurde dafür nach der Bestimmung der Längenänderungen durch Gewichte jeweils ein circa 1 cm langes Darmstück entnommen. Von diesen Dünndarmstücken wurden das Mesenterium und die Ingesta vollständig entfernt. Anschließend wurden die Darmstücke in kleinen Petri-Schalen gewogen. Nachdem der Darm bei 60 °C in einem Trockenschrank für mindestens 24 Stunden vollständig getrocknet worden war, wurde das Gewicht erneut bestimmt.

2.2.6.4 Histologische Aufarbeitung und histopathologische Beurteilung der Dünndarmschädigung

Nach der Bestimmung der Längenänderung der Dünndarmsegmente durch Gewichte wurde aus der Mitte der drei Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 zusätzlich jeweils ein circa 1 cm langes Darmstück für die histologische Aufarbeitung entnommen. Diese Darmproben wurden für mindestens 24 Stunden in Formalin (10%, neutral gepuffert) fixiert.

Anschließend wurden die Proben entwässert und in Paraffin eingebettet. Nachdem von den Paraffinblöcken mit einem Rotationsmikrotom 2-3 µm dicke Dünnschnitte erstellt worden waren, wurden sie in einem 40 °C warmen Wasserbad entfaltet und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen (Essen, Deutschland) vollautomatisch mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Die Dünndarmschädigung wurde lichtmikroskopisch anhand des Chiu-Park-Scores beurteilt (Chiu, C.J. et al., 1970; Park, P.O. et al., 1990). Der Chiu-Park-Score unterscheidet folgende Schweregrade:

- Score 0:** ungeschädigte *Tunica mucosa* (normale Zotten mit Becherzellen)
- Score 1:** Bildung von subepithelialen Grünhagen'schen Räumen (Abhebung der *Tunica mucosa* von der Basalmembran), kapilläre Stauung
- Score 2:** größere Ausdehnung der subepithelialen Grünhagen'schen Räume mit Ablösung des Epithels von den Zottenspitzen
- Score 3:** starke Ablösung des Epithels von den Zottenspitzen, vereinzelte nackte Zotten (ohne Epithel)
- Score 4:** nackte Zotten (*Tunica mucosa* in Krypten intakt)
- Score 5:** Zotten zerstört, Desintegration der *Lamina propria*, Hämorrhagien
- Score 6:** *Tunica mucosa* in Krypten geschädigt, Hämorrhagien, *Tunica submucosa* intakt
- Score 7:** Nekrose von *Tunica mucosa* und *Tunica submucosa*, Hämorrhagien
- Score 8:** transmurale Nekrose, Hämorrhagien

Pro Segment wurden je in einem Dünndarmschnitt bei 40-facher Vergrößerung fünf Gesichtsfelder beurteilt und der Befund gemittelt. Des Weiteren wurden die prozentualen Anteile restituerter, das heißt regenerierter Zotten (ohne Becherzellen), intakter Zotten und zerstörter Zotten dokumentiert. Die histopathologische Beurteilung der Dünndarmschnitte fand verblindet statt. Es erfolgte eine Gegenbefundung durch eine erfahrene medizintechnische Assistentin (Frau Natalie Boschenkov, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, Essen, Deutschland).

2.2.6.5 Beurteilung der Dünndarmschädigung durch einen makroskopischen Score

Nach Entnahme der Segmentproben für die Bestimmung des Nass-Trockengewichts und der histologischen Aufarbeitung (s. Kapitel 2.2.6.3/4) wurden die drei Segmente (je zwei Teilstücke) getrennt voneinander wieder in Petrischalen mit eisgekühltem Puffer (4 °C, 140 mM NaCl, 20 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, pH 7,4) überführt. Um die Dünndarmschädigung makroskopisch beurteilen zu können, mussten zunächst die

Dünndarmteilstücke präpariert werden. Das Mesenterium wurde entfernt und die Teilstücke wurden entlang der *Radix mesenterii* mit einer Knopfschere aufgeschnitten. Anschließend wurden die Teilstücke mit dem Lumen nach oben auf Styroporplatten in großen Petrischalen mit eisgekühltem Puffer mit Hilfe von Injektionskanülen aufgespannt. Die Befundung erfolgte durch die Anwendung eines makroskopischen Scores (= Makroscore) nach Petrat und Kollegen zur Quantifizierung von Ischämie-Reperfusionsschäden des Dünndarms (Petrat, F. et al., 2010). Der Makroscore unterscheidet vier Schweregrade:

Makroscore 0:	keine Petechien, keine Hämorrhagien
Makroscore 1:	wenige verstreute Petechien oder multiple petechiale Einblutungen mit oder ohne fokale Verteilung
Makroscore 3:	lokale Hämorrhagien oder lokaler Belag aus dunkelrotem Material, keine signifikante Verfärbung der Darmwand
Makroscore 9:	massive Hämorrhagien mit dunkelrot verfärbter Darmwand

Der Makroscore ist entsprechend des Hämoglobingehaltes des Gewebes exponentiell aufgebaut. Für jedes Stück wurde bestimmt, welcher Score mit welchem prozentualen Flächenanteil vorkam. Aus diesen Bestimmungen wurde für jedes Segment ein Durchschnittsscore gebildet. Aus den Mittelwerten der Segmente wurde ein Gesamtscore des Darms gebildet. Jedes Darmstück wurde bei gleicher Raumbeleuchtung (kein Tageslicht) und gleicher Kameraeinstellung fotografiert und für eine mögliche spätere Nachbefundung archiviert.

2.2.6.6 Bestimmung von Gewebeschädigungsparametern der Dünndarmsegmente im Darmhomogenat und Überstand des Darmhomogenats

Nach der makroskopischen Beurteilung der Dünndarmschädigung wurden die zwei Teilstücke der Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 jeweils in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 1,5 ml Homogenisierungspuffer (4 °C, 140 mM NaCl, 20 mM N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, 1 Tablette Complete® Proteaseinhibitorcocktail auf 50 ml Puffer, pH 7,4) mit Zusatz von Butylhydroxytoluol (20 µM (1 µl Butylhydroxytoluol/ 1 ml Homogenisierungspuffer) aus einer 20 mM Stammlösung (4,4 mg Butylhydroxytoluol in 1 ml 100% Ethanol gelöst, täglich frisch angesetzt) überführt. Der Zusatz von Butylhydroxytoluol diente der Verhinderung einer vorzeitigen Lipidperoxidation infolge der Gewebeaufarbeitung. Dann wurden die Darmstücke manuell mit Hilfe einer Schere zerkleinert. Die Gewebeproben wurden anschließend mittels Mahlkugeln in einer Schwingmühle (Retsch, Haan, Deutschland) bei maximaler Frequenz für 15 Minuten homogenisiert, sodass pro Dünndarmsegment 3 ml (2 x 1,5 ml) Gewebehomogenat entstand. Die Homogenate wurden separat pro Segment in Falcons (50 ml) überführt und

anschließend unter Verwendung eines Vortexmischers gut durchgemischt. Je 0,5 ml Darmhomogenat pro Segment wurden für die Bestimmung der Saccharase-Aktivität (s. Kapitel 2.2.6.6.1) in jeweils ein Falcon dekantiert. Das restliche homogenisierte Gewebe wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei 16.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände des Darmhomogenats wurde getrennt nach Segmenten in Falcons (15 ml) pipettiert, erneut gut durchmischt und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

2.2.6.6.1 Bestimmung der Saccharase-Aktivität

Die Bestimmung der Gewebe-Saccharase-Aktivität diene als Parameter der funktionellen Integrität des Dünndarms. Das Enzym Saccharase ist im Bürstensaum der Dünndarmschleimhaut lokalisiert. Der Verlust des Bürstensaums führt zu einem Verlust der Saccharase-Aktivität und somit kann die Saccharase-Aktivität als Maß für die Intaktheit des Bürstensaums herangezogen werden. Das Verfahren der Bestimmung der Saccharase-Aktivität nach Dahlqvist (Dahlqvist, A., 1984) und Oltean und Kollegen (Oltean, M. et al., 2007) wurde aufgrund der geringen Probenvolumina modifiziert. Je 0,5 ml Darmhomogenat pro Segment wurden in einem Wärmebad auf 37 °C erwärmt. Danach wurde mit 1 N Salzsäure (HCl) der pH auf 6,0 eingestellt (pH-Meter inoLab Level 1, WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland). Nun wurde getrennt nach Segmenten in je vier Eppendorf-Reaktionsgefäße je 0,1 ml Darmhomogenat transferiert. In zwei dieser Gefäße pro Segment befand sich je 2 mg Saccharose. Der Inhalt der Gefäße wurde per Vortexmischer gut gemischt. Alle Proben wurden für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Saccharase durch 5-minütiges Kochen in einem weiteren Wasserbad inaktiviert. Dann wurden die Proben zentrifugiert (16.000 x g für 15 Minuten) und anschließend wurde im Überstand die Glucosekonzentrationen (in mg/dl) mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Sensor Comfort Pro, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) gemessen. Die Messungen erfolgten in Doppelansätzen. Die von der Gewebe-Saccharase-Aktivität abhängige Abspaltung von Glucose aus Saccharose wird in mg/dl/30 Minuten/cm Darmsegment (nach Abzug der Leerwerte der Proben ohne Saccharose) angegeben.

2.2.6.6.2 Nachweis von Hämoglobin anhand der Soret-Bande des Hämoglobins

Die Quantifizierung des Gewebehämoglobins erfolgte durch die Bestimmung des Absorptionsmaximums der Hämoglobin-Soret-Bande zwischen 408 und 414 nm in 100 µl Darmhomogenatüberstand. Der Nullabgleich erfolgte gegen den Homogenisierungspuffer und die Absorption wurde um die unspezifische Absorption bei 475 nm korrigiert. Die

Hämoglobinkonzentration wurde mittels des molaren Extinktionskoeffizientens des Hämoglobins ($\epsilon = 131.000 \text{ l/mol} \times \text{cm}^{-1}$) und des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet und wird in $\mu\text{mol/cm}$ Darmsegment angegeben. Die Messungen erfolgten im Doppelansatz.

2.2.6.6.3 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase-Aktivität des Dünndarmgewebes wurde als Maß für die Präsenz neutrophiler Granulozyten bestimmt. Es wurde das Verfahren nach Krueger und Kollegen angewandt (Krueger, A.J. et al., 1990). Die Bestimmungen erfolgten anhand der Wasserstoffperoxid-abhängigen Oxidation von o-Dianisidin. Es wurden 1,67 mg o-Dianisidin in 10 ml Kaliumdihydrogenphosphat/Dikaliumhydrogenphosphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)-Puffer (50 mM, pH 6,0) gelöst und die Reaktion durch die Zugabe von 150 μl Wasserstoffperoxid (9,78 mM) gestartet. Die Messung der Proben erfolgte automatisch durch den Vitalab Selectra E (VWR International, Darmstadt, Deutschland). Die Bestimmungen erfolgten im Doppelansatz und werden in $\text{U/l} \times \text{cm}^{-1}$ angegeben.

2.2.7 Statistik

Bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppen \pm Standardfehler (*SEM, standard error of the mean*) aus vier bis acht voneinander unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde mittels *one-way*-Varianzanalyse (ANOVA) und einer *Post-hoc*-Analyse nach Fisher (*Least Significant Difference, LSD*) bestimmt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm XLSTAT 2010 (Addinsoft, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Modell der absoluten Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms

Die Vorversuche zur Etablierung eines Modells einer absoluten Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms zeigten, dass eine absolute Ischämie des gesamten Rattendünndarms durch die Okkludierung der *A. mesenterica superior* und der zugehörigen Kollateralkreisläufe zeiteffektiv nicht möglich ist. Deshalb fiel der Entschluss ein Modell einer segmentalen absoluten Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms zu etablieren. Die Wahl fiel auf das in Kapitel 2.2.4.3 beschriebene Modell, da dies effektiv die komplette Blutversorgung des jeweiligen Dünndarmsegmentes, sogar das Netzwerk von kommunizierenden submukosalen Gefäßen, ausschaltet. Dies wurde durch Messungen der Mikrozirkulationsparameter in Vorversuchen (keine Ergebnisdarstellung) und in Serie 2 (s. Kapitel 3.2.2) mit Hilfe des Laserdoppler-Flowmeters O2C (LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Deutschland) nachgewiesen.

3.2 Effekte von Glycin auf hämodynamische und systemische Parameter bei segmentaler absoluter Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms

Bei der Auswertung der hämodynamischen und systemischen Parameter wird auf eine separate graphische Darstellung der Ergebnisse der Gruppen „I, Kontrolle“ und „I, Glycin“ verzichtet, da die Ergebnisse dieser Gruppen den Ergebnissen der Vorlauf- und Ischämiephasen der Gruppen „I/R, Kontrolle“ und „I/R, Glycin“ entsprechen.

3.2.1 Einfluss auf die Vitalparameter

Der mittlere arterielle Blutdruck lag in der normoxischen Kontrollgruppe zu Versuchsbeginn bei $99,3 \pm 9,2$ mmHg (s. Abb. 7a). Er blieb während des gesamten Versuchszeitraumes (Vorlauf-, Ischämie- und Reperusionsphase) weitgehend konstant zwischen $82,7 \pm 5,9$ mmHg und $105,8 \pm 3,4$ mmHg. Die Eröffnung des Bauchraumes bewirkte einen kurzzeitigen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes (Zeitpunkt 20 min). Die mesenteriale Ischämie hatte keine Veränderung zur Folge (I, Kontrolle: durchschnittlich $88,7 \pm 1,1$ mmHg; Normoxie: durchschnittlich $89,2 \pm 3,2$ mmHg). In der Reperusionsphase war der mittlere arterielle Blutdruck der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Normoxiegruppe (I/R, Kontrolle: durchschnittlich $77,8 \pm 2,8$ mmHg; Normoxie: durchschnittlich $98,0 \pm 3,2$ mmHg). Glycin hatte in der ischämischen Phase keinen Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck (I, Glycin: durchschnittlich $92,4 \pm 1,3$ mmHg). In der Reperusionsphase hatte Glycin tendenziell (nicht signifikant) einen positiven Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck (I/R, Glycin: durchschnittlich $84,1 \pm 1,2$ mmHg).

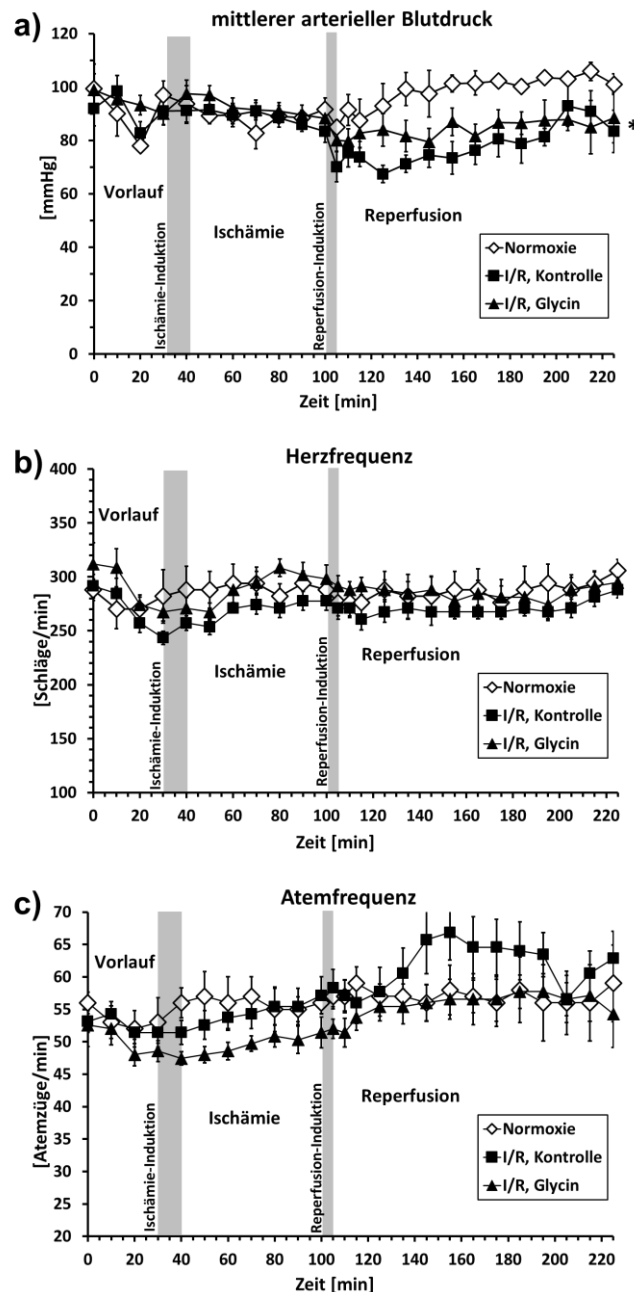


Abbildung 7: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf die Vitalparameter mittlerer arterieller Blutdruck (a), Herzfrequenz (b) und Atemfrequenz (c) von Ratten während der segmentalen, absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms (Serie 1).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen. Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. An die Phase der Ischämie schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. Glycin wurde in einer Dosierung von $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum Ende der Reperfusion infundiert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). Die Signifikanzbestimmung für repetitive Messungen erfolgte jeweils für die Phase der Ischämie und der Reperfusion. * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe.

Die Herzfrequenz der Tiere lag in der normoxischen Kontrollgruppe zu Versuchsbeginn bei $288 \pm 9,8$ Schläge/min (s. Abb. 7b). Im Verlauf des Versuches blieb sie größtenteils konstant. Die mesenteriale Ischämie und Reperfusion bewirkte in der I/R-Kontrollgruppe keine Veränderung der Herzfrequenz. Auch Glycin hatte in der Ischämie und Reperfusion keinen Effekt auf sie. In der Zusammenschau aller Versuchsgruppen lag die Herzfrequenz minimal bei $243,4 \pm 6,3$ Schläge/min und maximal bei $312 \pm 19,6$ Schläge/min.

Die Atemfrequenz der Normoxiegruppe lag zu Beginn des Versuches bei $56 \pm 1,6$ Atemzüge/Minute (s. Abb. 7c). Über den gesamten Versuchszeitraum war sie nahezu konstant bei Werten zwischen $52 \pm 2,8$ Atemzüge/Minute und $59 \pm 5,9$ Atemzüge/Minute. Die mesenteriale Ischämie bewirkte keine Veränderung (I, Kontrolle: durchschnittlich $54,3 \pm 0,7$ Atemzüge/Minute; Normoxie: durchschnittlich $56 \pm 0,5$ Atemzüge/Minute). In der Reperfusion war die Atemfrequenz der Kontrollgruppe tendenziell (nicht signifikant) höher als in der Normoxiegruppe (I/R, Kontrolle: durchschnittlich $61,4 \pm 1,4$ Atemzüge/Minute; Normoxie: durchschnittlich $57,1 \pm 0,6$ Atemzüge/Minute). Glycin hatte während der Ischämie und Reperfusion tendenziell (nicht signifikant) einen absenkenden Effekt auf die Atemfrequenz (I, Glycin: durchschnittlich $49,5 \pm 0,5$ Atemzüge/Minute; I/R, Glycin: durchschnittlich $55,5 \pm 0,8$ Atemzüge/Minute).

Die Vitalparameter Körpertemperatur und Sauerstoffsättigung wurden weder durch die mesenteriale Ischämie und Reperfusion noch durch die Infusion von Glycin signifikant verändert (graphisch nicht gezeigt). Im gesamten Versuchszeitraum war die Körpertemperatur der Tiere aller Versuchsgruppen zwischen $36,3 \pm 0,1$ °C und $37,8 \pm 0,0$ °C. Die niedrigsten Werte wurden nach der Eröffnung des Bauchraumes (Zeitpunkt 20 min) gemessen. Die gemessenen Werte der Sauerstoffsättigung lagen während des gesamten Versuchszeitraumes in allen Versuchsgruppen nahezu konstant zwischen $96,9 \pm 0,3\%$ und $98,5 \pm 1,3\%$.

Die unter Berücksichtigung des Blutdruckes, der Atemfrequenz und vor allem der Narkosetiefe erforderliche, über die Narkosemaske zugeführte Isoflurankonzentration lag zu Versuchsbeginn in allen Versuchsgruppen bei 1,5% Isofluran in 100% Sauerstoff (graphisch nicht gezeigt). In der normoxischen Kontrollgruppe konnte sie über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant zwischen $1,45 \pm 0,05\%$ und $1,60 \pm 0,10\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff gehalten werden. Die mesenteriale Ischämie erforderte keine Veränderung der Narkosesteuerung (I, Kontrolle: durchschnittlich $1,34 \pm 0,01\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff; Normoxie: durchschnittlich $1,44 \pm 0,03\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff). Während der Reperfusion wurde die Isoflurankonzentration für die Tiere der ischämischen Kontrollgruppe im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (I/R, Kontrolle: durchschnittlich $1,11 \pm 0,04\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff; Normoxie: durchschnittlich $1,52 \pm 0,03\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff). Die Tiere der Glycingruppe

erhielten sowohl in der Ischämie als auch in der Reperfusion tendenziell (nicht signifikant) eine höhere Isofluranzufuhr als die Tiere der ischämischen Kontrollgruppe (I, Glycin: durchschnittlich $1,55 \pm 0,01\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff; I/R, Glycin: durchschnittlich $1,28 \pm 0,04\%$ Isofluran in 100% Sauerstoff).

Insgesamt hatte somit die Infusion von Glycin ($20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ Glycin) weder während der segmentalen absoluten Ischämie noch während der nachfolgenden Reperfusion einen signifikanten Effekt auf die Vitalparameter mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur und Sauerstoffsättigung und keinen signifikanten Einfluss auf die Narkosesteuerung.

3.2.2 Einfluss auf die Mikrozirkulationsparameter des Dünndarms

Für Serie 1 (Messungen am ausgelagerten Darm, s. Kapitel 2.2.2, Abb. 5) wird der zeitliche Verlauf der Blutsauerstoffsättigung in der Dünndarmwand nur für Segment 3 dargestellt, da die generellen Aussagen der mit dem O2C-Gerät ermittelten Ergebnisse für die Darmsegmente 3, 6 und 9 übereinstimmend sind (s. Abb. 8). Die Ausgangswerte der Sauerstoffsättigung in der Darmwand lagen für alle Versuchsgruppen und Dünndarmsegmente zwischen $77,1 \pm 4,4\%$ und $87,9 \pm 1,7\%$ (s. Abb. 8a/b). In der Normoxiegruppe blieben die Werte über den gesamten Versuchszeitraum in diesem Bereich. Die mesenteriale Ischämie führte in der ischämischen Kontrollgruppe zu einem signifikanten Abfall der Sauerstoffsättigung auf durchschnittlich $12,5 \pm 1,4\%$. In der Reperfusion stieg die Sauerstoffsättigung wieder auf durchschnittlich $42,2 \pm 0,9\%$ an, blieb jedoch mit diesen Werten, die circa 50% der Ausgangswerte entsprechen, signifikant unter der zeitlich entsprechenden Sauerstoffsättigung der Normoxiegruppe. Tendenziell (nicht signifikant) waren die Messwerte der Versuchsgruppen mit Glycingabe während der Ischämie und der Reperfusion höher (s. Abb. 8b).

In den Versuchen mit den isolierten Dünndarmsegmenten (Serie 2, s. Kapitel 2.2.2) zeigten sich im Vergleich zu den Ergebnissen der Ischämiephase von Serie 1 in den drei Dünndarmsegmenten höhere Sauerstoffsättigungen mit einem Mittelwert von $23,6 \pm 1,4\%$ in der ischämischen Kontrollgruppe bei vergleichbaren Ausgangswerten von $79,8 \pm 10,3\%$ bis $89,0 \pm 2,4\%$ (s. Abb. 8c). Glycin hatte keinen Effekt auf die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins während der Ischämie der isolierten Dünndarmsegmente.

Hinsichtlich des Mikrozirkulationsparameters „Sauerstoffsättigung des Hämoglobins“ hatte Glycin im Vergleich zur ischämischen Kontrollgruppe sowohl am ausgelagerten Darm (Serie 1) als auch bei den Versuchen mit den isolierten Dünndarmsegmenten (Serie 2) keinen signifikanten Effekt.

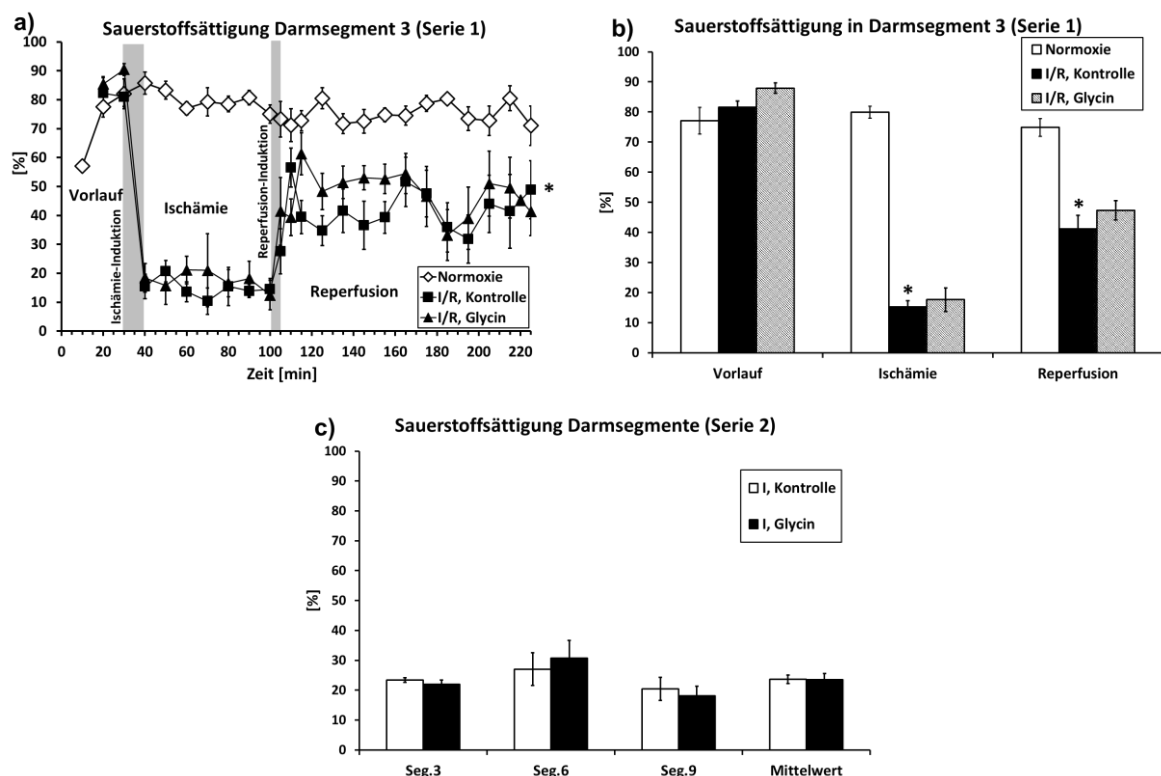


Abbildung 8: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf den Mikrozirkulationsparameter Sauerstoffsättigung während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion: a) Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung in Darmsegment 3 des ausgelagerten Dünndarms der Ratte (Serie 1), b) Sauerstoffsättigung in Darmsegment 3 des ausgelagerten Dünndarms der Ratte (Serie 1, Mittelwerte der Versuchsphasen), c) Sauerstoffsättigung der drei isolierten Darmsegmente in der Ischämie (Serie 2, Mittelwerte für die Einzelsegmente und für die drei Darmsegmente gemeinsam während der Ischämiephase).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. An die Phase der Ischämie schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Blutsauerstoffsättigung im Gewebe der drei isolierten und auf einer Wärmeplatte gelagerten Dünndarmsegmente wurde über eine Ischämiedauer von 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: n=4; I, Kontrolle und I, Glycin: n=6; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7). Die Signifikanzbestimmung für repetitive Messungen erfolgte jeweils für die Phase der Ischämie und der Reperfusion. *p < 0,05 gegenüber der Normoxiegruppe. Abkürzungen: Seg.= Segment.

Die Ausgangswerte des Mikrozirkulationsparameter „relative Hämoglobinemenge“ in der Dünndarmwand lagen für alle Versuchsgruppen in Serie 1 (ausgelagerte Darmsegmente) zwischen $74,7 \pm 2,9$ und $80,6 \pm 1,0$ AU (Arbitrary Unit, gerätespezifische, relative Einheit) (graphisch nicht gezeigt). In der normoxischen Versuchsgruppe hielten sich die Werte während des Versuches im unteren Bereich dieser Ausgangswerte. Die mesenteriale

Ischämie hatte keinen Effekt auf die relative Hämoglobinmenge in den Mikrogefäßen der Dünndarmwand (I, Kontrolle: durchschnittlich $76,9 \pm 6,0$ AU). Während der Reperfusionsphase stiegen die Werte der I/R-Kontrollgruppe im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe signifikant an (I/R, Kontrolle: durchschnittlich $83,5 \pm 5,1$ AU; Normoxie: durchschnittlich $68,1 \pm 0,9$ AU). Glycin hatte weder in der Ischämie noch in der Reperfusion einen signifikanten Effekt auf den Parameter relative Hämoglobinmenge (I, Glycin: durchschnittlich $74,7 \pm 5,2$ AU; I/R, Glycin: durchschnittlich $80,1 \pm 5,4$ AU).

Bei den Versuchen mit den isolierten Dünndarmsegmenten (Serie 2) waren die gemessenen relativen Hämoglobinwerte deutlich niedriger als in Serie 1 (graphisch nicht gezeigt). Der Gesamtmittelwert der drei Dünndarmsegmente der Kontrollgruppe betrug während der Ischämie durchschnittlich $44,9 \pm 5,1$ AU bei vergleichbaren Ausgangswerten von $71,3 \pm 2,3$ AU bis $82,5 \pm 2,3$ AU in den drei Dünndarmsegmenten. Glycin hatte auch in Serie 2 keinen Effekt auf diesen Parameter (I, Glycin: durchschnittlich $45,0 \pm 5,8$ AU).

Für Serie 1 (Messungen am ausgelagerten Darm) wird der zeitliche Verlauf des Blutflusses (*flow*) in der Dünndarmwand nur für Segment 3 dargestellt, da die generellen Aussagen der mit dem O2C-Gerät ermittelten Ergebnisse für die Darmsegmente 3, 6 und 9 übereinstimmend sind (s. Abb. 9a/b). Die Ausgangswerte aller Versuchsgruppen und Dünndarmsegmente der Serie 1 (ausgelagerter Darm) lagen zwischen $245,2 \pm 24,5$ AU und $344,5 \pm 7,4$ AU. In allen Versuchsgruppen waren die gemessenen Werte der Segmente 6 und 9 etwas niedriger als die gemessenen Werte für Segment 3, wobei im Segment 9, auch in Serie 2 (s. Abb. 9c), die niedrigsten Werte gemessen wurden. In den Dünndarmsegmenten der normoxischen Versuchsgruppe schwankte der Blutfluss während des gesamten Versuchszeitraums um 300 AU (s. Abb. 9a). In der absoluten Ischämie fiel der Blutfluss in der ischämischen Kontrollgruppe auf Werte zwischen $2,4 \pm 0,6$ AU und $5,9 \pm 0,8$ AU und damit auf weniger als 3% der Ausgangswerte ab (s. Abb. 9a/b). Der Blutfluss stieg in der Reperfusion in der I/R-Kontrollgruppe in den drei Dünndarmsegmenten wieder auf durchschnittliche Werte zwischen $88,9 \pm 13,3$ AU und $121,1 \pm 16,0$ AU an, was circa 40% des Ausgangsblutflusses entspricht (signifikant niedriger als die zeitlich entsprechenden Werte der Normoxiegruppe). Glycin hatte weder während der Ischämie noch während der Reperfusion einen Effekt auf den Blutfluss (s. Abb. 9a/b).

Auch in Serie 2, dem Modell in welchem durch die Isolierung und Entnahme der Dünndarmsegmente definitiv kein Blutfluss mehr bestand (s. Kapitel 2.2.4.3), wurden mit dem O2C-Gerät Messwerte während der sicheren *no-flow*-Ischämie bestimmt. Der Gesamtmittelwert der drei Dünndarmsegmente betrug in der ischämischen Kontrollgruppe $4,7 \pm 0,7$ AU und in der Glycingruppe $4,0 \pm 0,9$ AU (s. Abb. 9c) bei vergleichbaren Ausgangswerten im Tier von $240,0 \pm 33,7$ AU bis $322,3 \pm 26,3$ AU in den drei Dünndarmsegmenten.

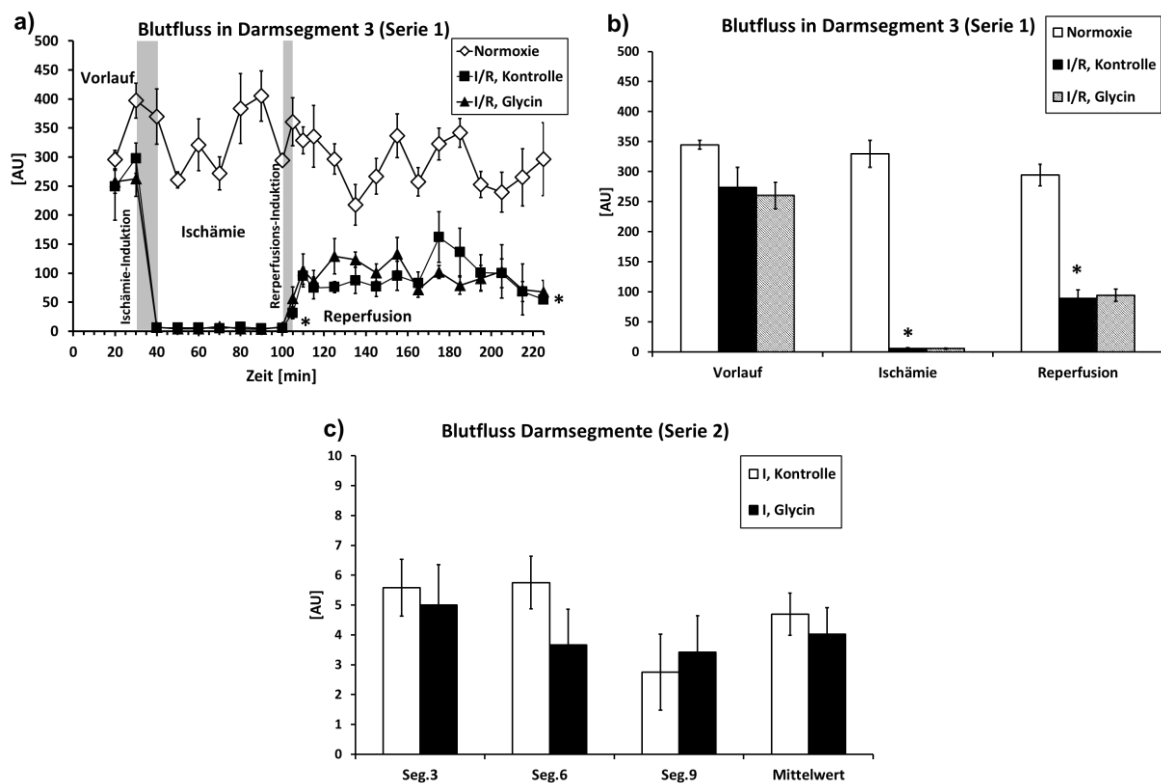


Abbildung 9: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf den Mikrozirkulationsparameter Blutfluss während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion: a) Zeitlicher Verlauf des Blutflusses in Darmsegment 3 des ausgelagerten Dünndarms der Ratte (Serie 1), b) Blutfluss in Darmsegment 3 des ausgelagerten Dünndarms der Ratte (Serie 1, Mittelwerte der Versuchsphasen), c) Blutfluss der drei isolierten Darmsegmente in der Ischämie (Serie 2, Mittelwerte für die Einzelsegmente und für die drei Darmsegmente gemeinsam während der Ischämiephase). Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion an den separierten Segmenten 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. An die Phase der Ischämie schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Der Blutfluss im Gewebe der drei isolierten und auf einer Wärmeplatte gelagerten Dünndarmsegmente wurde über eine Ischämiedauer von 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW \times h⁻¹ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: n=4; I, Kontrolle und I, Glycin: n=6; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7). Die Signifikanzbestimmung für repetitive Messungen erfolgte jeweils für die Phase der Ischämie und der Reperfusion. *p < 0,05 gegenüber der Normoxiegruppe. Abkürzungen: Seg.= Segment, AU = Arbitrary Unit (gerätespezifische, relative Einheit).

Zusammenfassend hatte die Infusion von Glycin weder während der segmentalen absoluten Ischämie noch während der nachfolgenden Reperfusion einen Einfluss auf die Mikrozirkulationsparameter Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobinmenge und Blutfluss in der Dünndarmwand.

3.2.3 Einfluss auf die Parameter der Blutgasanalyse, die Plasmaenzymaktivitäten und die Aminosäurenkonzentrationen im Blut

Bei der Auswertung der Blutgasanalyse-Parameter (pH-Wert, arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdrücke (pO_2 , pCO_2), Sauerstoffsättigung (sO_2), *Base Excess* (BE), Standardbikarbonat (HCO_3^-), Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hct), Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}), Chlorid (Cl^-), Glucose (Glu), Lactat (Lac), Osmolarität (mOsm)) konnte bei keinem Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen der Normoxie- und den Kontrollgruppen (I, Kontrolle; I/R, Kontrolle) und zwischen den Kontroll- und Glycingruppen (I, Glycin; I/R, Glycin) nachgewiesen werden. Nur durch den Versuchsaufbau an sich kam es zu Veränderungen. Beispielsweise zeigte sich im Versuchsverlauf bei den normoxischen Tieren eine leichte Erniedrigung des pH-Wertes und ein geringfügiger Anstieg des Laktatwertes (graphisch nicht gezeigt).

Im Verlauf des Versuchszeitraumes stiegen die Plasmaenzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH), der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der Alanin-Aminotransferase (ALAT) in allen Versuchsgruppen des Modells des ausgelagerten Darms (Serie 1) in gleichem Maße leicht an (graphisch nicht gezeigt). Diesbezüglich bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Normoxie- und den Kontrollgruppen (I, Kontrolle; I/R, Kontrolle) oder zwischen den Kontroll- und Glycingruppen (I, Glycin; I/R, Glycin).

Die Bestimmung der Aminosäurespiegel von Alanin, Arginin, Aspargin, Asparaginsäure, Citrullin, Glutamin, Glutaminsäure, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin und Valin im Blutplasma zeigte im zeitlichen Versuchsablauf keinen signifikanten Unterschied zwischen der Normoxie- und den Kontrollgruppen (I, Kontrolle; I/R, Kontrolle) und zwischen den Kontroll- und Glycingruppen (I, Glycin; I/R, Glycin) (graphisch nicht gezeigt). Allein die Bestimmung des Glycinspiegels zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Glycingruppe (s. Abb. 10). Die Ausgangswerte der Glycinspiegel aller Versuchsgruppen lagen zwischen $255,5 \pm 8,7 \mu\text{mol/l}$ Plasma und $277,0 \pm 12,9 \mu\text{mol/l}$ Plasma. In der Normoxie- und der Kontrollgruppe blieb die Glycinkonzentration über den ganzen Versuchszeitraum weitgehend konstant. In der Glycingruppe war der Glycinspiegel nach 30 Minuten Glycingabe ($20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ Glycin) auf $441,3 \pm 16,2 \mu\text{mol/l}$ Plasma angestiegen (Zeitpunkt 2, vor Ischämiebeginn). Nach 60 Minuten Ischämie und insgesamt 90 Minuten Glycinapplikation stieg der Glycinspiegel auf $622,2 \pm 30,5 \mu\text{mol/l}$ Plasma an (Zeitpunkt 3). 10 Minuten später (nach 5 Minuten Reperfusion) lag der Glycinspiegel bei seinem Maximum von $691,8 \pm 33,1 \mu\text{mol/l}$ Plasma (Zeitpunkt 4). Im weiteren Verlauf der Reperfusion (insgesamt 120 Minuten Reperfusion) fiel der Glycinspiegel trotz der kontinuierlichen Glycinapplikation auf $655,1 \pm 38,7 \mu\text{mol/l}$ Plasma ab (Zeitpunkt 5).

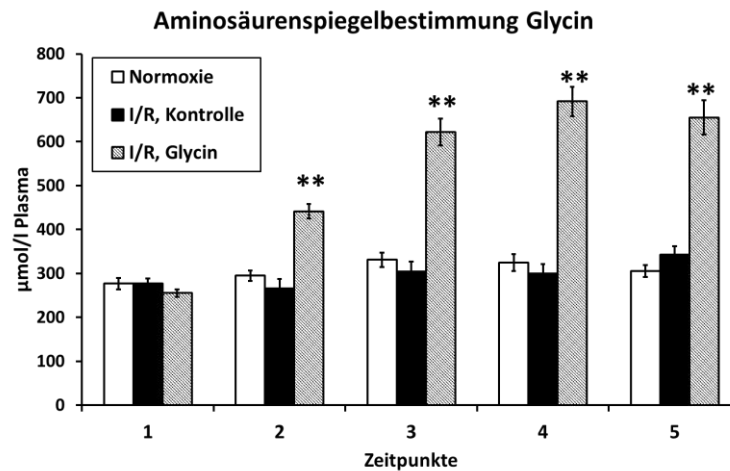


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Glycinkonzentration im Rattenblutplasma während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion (Serie 1).

Zeitpunkte der Bestimmungen: 1 = direkt nach Arterienkatheter-Einlage, 2 = vor Ischämiebeginn, 3 = nach 60 min Ischämie, 4 = nach 5 min Reperfusion, 5 = nach 120 min Reperfusion.

Den Versuchstieren der Glycingruppen wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ (in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst) ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) infundiert. Insgesamt wurde den Versuchstieren in den Glycin-Gruppen bis zum Ende der Ischämie 30 mg/kg KGW und bis zum Ende der Reperfusion 71,67 mg/kg KGW Glycin appliziert. Den Versuchstieren der normoxischen Gruppe und der I/R-Kontrollgruppe wurde 0,9%ige Kochsalzlösung ohne Zusatz von Glycin infundiert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: n=4; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7).

**p < 0,05 gegenüber der I/R, Kontrollgruppe.

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass Glycin keinen Einfluss auf die Parameter der Blutgasanalyse, die Plasmaenzymaktivitäten oder andere Aminosäurenkonzentrationen als Glycin selbst im Blut hatte.

3.3 Effekte von Glycin auf die Gewebeschädigungsparameter des Dünndarms bei segmentaler absoluter Ischämie und Reperfusion

Bei der Auswertung der Gewebeschädigungsparameter des Dünndarms werden anders als in Kapitel 3.2 die Ergebnisse aller Gruppen („Normoxie“, „I, Kontrolle“, „I, Glycin“, „I/R, Kontrolle“ und „I/R, Glycin“) betrachtet und verglichen. Viele der Ergebnisse werden pro Kilogramm Körpergewicht der Ratten dargestellt. Daher ist es wichtig anzumerken, dass die Mittelwerte der Gruppen bezüglich des Körpergewichtes der Ratten nicht signifikant unterschiedlich waren (Normoxie: 440,0 \pm 7,9 g; I, Kontrolle: 451,0 \pm 10,0 g; I, Glycin: 444,1 \pm 9,5 g; I/R, Kontrolle: 437,6 \pm 7,1 g; I/R, Glycin: 439,3 \pm 11,1 g).

3.3.1 Einfluss auf das Dünndarmgewicht

Als Maß für den Flüssigkeitsgehalt des Darms, insbesondere der intraluminalen Flüssigkeitsansammlung und in geringerem Maße der Gewebeödeme in der Darmwand,

wurde das Dünndarmgewicht bestimmt. Der normoxische Dünndarm wog nach Versuchsende durchschnittlich $25,1 \pm 1,3$ g/kg KGW (s. Abb. 11). Die mesenteriale Ischämie von 60 Minuten bewirkte in der ischämischen Kontrollgruppe ein signifikant höheres Dünndarmgewicht von $29,6 \pm 0,8$ g/kg KGW. Im Verlauf der Reperfusion nahm das Dünndarmgewicht noch einmal deutlich zu (I/R, Kontrolle: $46,8 \pm 1,3$ g/kg KGW). Die Glycingabe bewirkte in der Ischämie-Phase im Vergleich zur ischämischen Kontrollgruppe tendenziell (nicht signifikant) ein niedrigeres Gewicht des Dünndarms (I, Glycin: $27,1 \pm 1,0$ g/kg KGW). Am Ende der Reperfusion war der Dünndarm der I/R-Glycingrouppe signifikant leichter als der Dünndarm der I/R-Kontrollgruppe (I/R, Glycin: $43,0 \pm 1,3$ g/kg KGW).

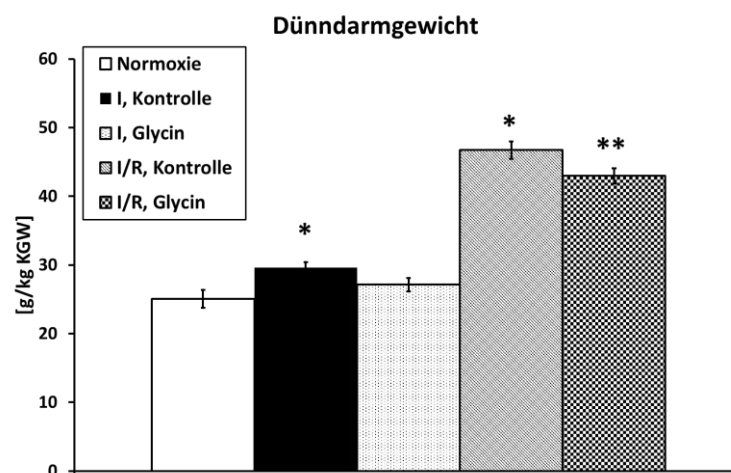


Abbildung 11: Effekte von Glycin auf das Dünndarmgewicht von Ratten am Ende der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion (Serie 1).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen. Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. Glycin wurde in einer Dosierung von $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) infundiert. Das Dünndarmgewicht wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion bestimmt.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I, Kontrolle und I, Glycin: $n=6$, I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe, ** $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

3.3.2 Einfluss auf die gewichtsabhängige Längenänderung des postischämischen Dünndarms

Die am Ende des Versuches (Serie 1, ausgelagerter Darm) für die normoxische Gruppe bestimmte Länge der Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 wurde durch angehängte Gewichte gewichtsabhängig erhöht (Abb. 12a). Die durchschnittliche Längenzunahme in der

normoxischen Gruppe beim Anhängen eines Gewichtes von 1,16 g lag bei $22,1 \pm 0,5\%$, bei einem Gewicht von 3,46 g bei $33,7 \pm 1,9\%$ und bei einem Gewicht von 9,68 g bei $43,5 \pm 1,9\%$. Bei erneuter Messung ohne Gewicht (0 g) wurde eine durchschnittliche Längenzunahme von $21,6 \pm 1,6\%$ im Vergleich zur Ausgangslänge gemessen.

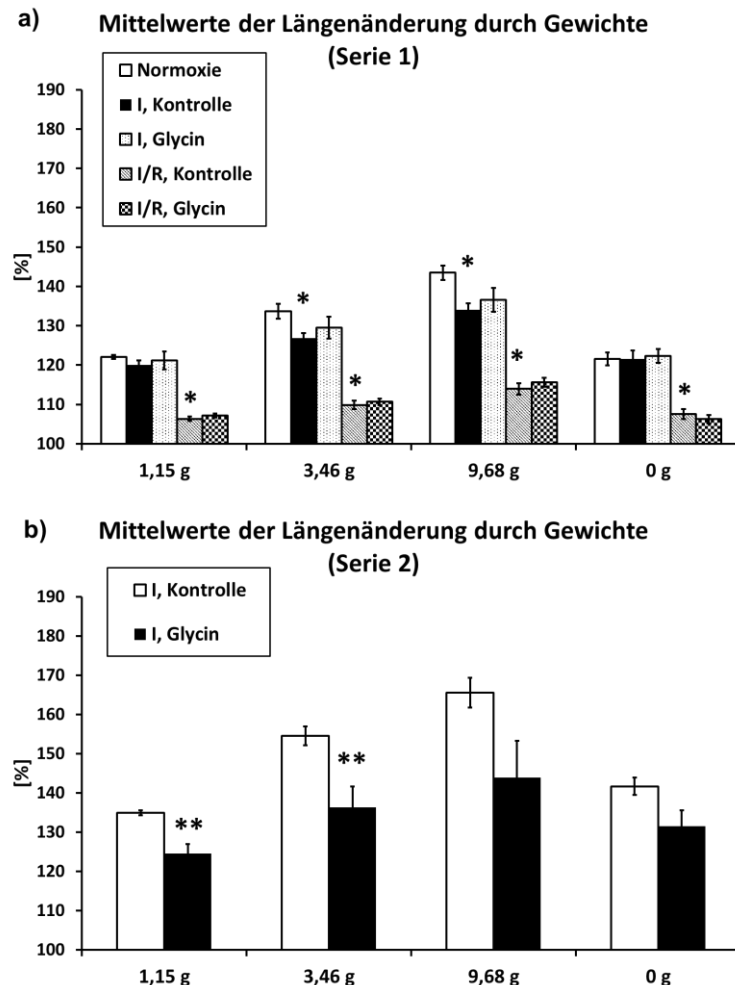


Abbildung 12: Effekte von Glycin auf die gewichtsabhängige Längenänderung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion: a) Mittelwerte der Längenänderung der ausgelagerten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 1), b) Mittelwerte der Längenänderung der isolierten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 2).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Ischämie der drei isolierten Dünndarmsegmente wurde 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Die prozentualen Längenänderungen infolge von unterschiedlichen, an die Darmsegmente angehängten (exponentiell aufsteigenden) Gewichten wurden je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I, Kontrolle und I, Glycin: $n=6$; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe, ** $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

Nach der mesenterialen Ischämie wurde in der ischämischen Kontrollgruppe im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe im Durchschnitt eine geringere Längenzunahme gemessen (signifikant bei 3,46 g und 9,68 g Gewicht, tendenziell bei 1,16 g und 0 g Gewicht; I, Kontrolle: 1,16 g Gewicht: $20,0 \pm 1,2\%$, 3,46 g Gewicht: $26,9 \pm 1,2\%$, 9,68 g Gewicht: $34,0 \pm 1,7\%$, 0 g Gewicht: $21,5 \pm 2,1\%$). Nach Ischämie und Reperfusion wurde eine noch geringere Längenzunahme gemessen (I/R, Kontrolle: 1,16 g Gewicht: $6,3 \pm 0,6\%$, 3,46 g Gewicht: $9,9 \pm 1,1\%$, 9,68 g Gewicht: $14,0 \pm 1,5\%$, 0 g Gewicht: $7,6 \pm 1,2\%$). In den Glycingruppen wurde im Vergleich zu den Kontrollgruppen sowohl nach der Ischämie als auch nach der Reperfusion tendenziell höhere Längenzunahmen gemessen (außer bei I/R, Glycin: 0 g Gewicht, s. Abb. 12a; I, Glycin: durchschnittliche Zunahme zwischen $21,1 \pm 2,3\%$ und $36,6 \pm 3,0\%$; I/R, Glycin: durchschnittliche Zunahme zwischen $6,2 \pm 1,1\%$ und $15,6 \pm 1,2\%$).

Die Ergebnisse der Versuche der isolierten Dünndarmsegmente (Serie 2) zeigten eine niedrigere (signifikant bei 1,16 g und 3,46 g Gewicht, tendenziell bei 9,68 g und 0 g Gewicht) prozentuale Längenzunahme der Glycingruppe gegenüber der Kontrollgruppe bei etwas niedrigeren absoluten Ausgangswerten (s. Abb. 12b).

Glycin verminderte im Verlauf einer kurzen Ischämiephase (10 Minuten, Serie 2) die prozentuale Längenzunahme. Dagegen konnte während einer längeren Ischämiephase (60 Minuten, Serie 1) und anschließender Reperfusionsphase kein Glycineffekt gezeigt werden.

3.3.3 Einfluss auf das Ausmaß von Gewebeödemen der Darmwand

Als selektives Maß für Gewebeödeme der Darmwand wurde die prozentuale Zunahme der Gewichtsdifferenz zwischen Nass- und Trockengewicht (durch Trocknung) des Darmgewebes bestimmt. Der Mittelwert der nach den Versuchen bestimmten prozentualen Gewichtsdifferenz des Darmgewebes der Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 lag in der Normoxiegruppe bei $-72,2 \pm 2,1\%$ (s. Abb. 13d). Die mesenteriale Ischämie bewirkte in der ischämischen Kontrollgruppe in Dünndarmsegment 3 und 9 durch eine Zunahme des Nassgewichts (= Gewebeödem) eine signifikant höhere prozentuale Gewichtsabnahme als bei den entsprechenden normoxischen Segmenten (s. Abb. 13a/c; I, Kontrolle: Darmsegment 3: $-79,8 \pm 0,9\%$; Darmsegment 9: $-80,1 \pm 1,0\%$). Für das Dünndarmsegment 6 und bei der Gesamtbetrachtung der Gruppe „I, Kontrolle“ war das Ausmaß von Gewebeödem in der Kontrollgruppe gegenüber dem in der Normoxiegruppe zwar tendenziell größer, aber nicht signifikant (s. Abb. 13b/d). Für die Dünndarmsegmente 3 und 9 und bei der Gesamtbetrachtung der Gruppe „I/R, Kontrolle“ war das Ausmaß von Gewebeödem in der Reperfusion gegenüber dem in der Normoxiegruppe signifikant

größer (s. Abb. 13a/c/d). Beim Vergleich der Gesamtmittelwerte der ischämischen und der I/R-Kontrollgruppe fällt auf, dass durch die Reperfusion die Gewebeödeme zunehmen (s. Abb. 13d; I/R, Kontrolle: $-80,5 \pm 1,2\%$). Wenn man hingegen die Dünndarmsegmente 3 und 9 getrennt betrachtet, änderte sich das Ausmaß von Gewebeödem der Ischämiephase durch die zusätzliche Reperfusion nicht (s. Abb. 13a/c).

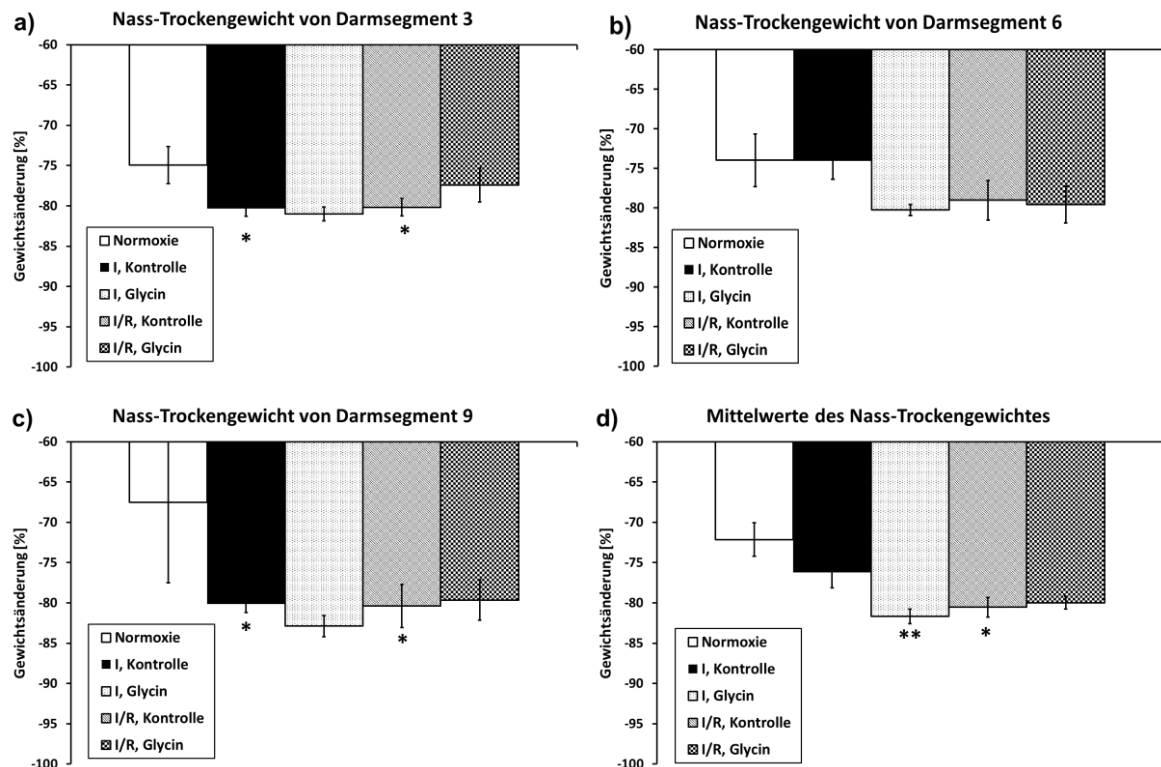


Abbildung 13: Effekte von Glycin auf das Ausmaß der Gewebeödembildung in der Dünndarmwand der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion (Serie 1): a) Nass-Trockengewicht von Darmsegment 3, b) Nass-Trockengewicht von Darmsegment 6, c) Nass-Trockengewicht von Darmsegment 9, d) Gesamtmittelwerte der Nass-Trockengewichte der drei Dünndarmsegmente.

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen. Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperfusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. Glycin wurde in einer Dosierung von $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum Ende der Reperfusion infundiert. Das Nass-Trockengewicht wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert. Je größer die prozentuale Gewichtsänderung vom Nass- zum Trockengewicht ist, desto mehr Flüssigkeit (= Ödem) war in der Darmwand.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I, Kontrolle und I, Glycin: $n=6$; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe, ** $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

Glycin hatte bei der Einzelbetrachtung der drei Dünndarmsegmente in keinem Dünndarmsegment einen signifikanten Effekt. Tendenziell zeigte sich aber bei den

Ischämiegruppen eine Zunahme des Gewebeödems durch Glycin und bei den I/R-Gruppen eher eine Abnahme des Gewebeödems durch Glycin (Ausnahme Darmsegment 6, s. Abb. 13b). Die Berechnung der Gesamtmittelwerte der drei Dünndarmsegmente ergab eine signifikante Erhöhung des Ausmaßes von Gewebeödem der ischämischen Glycingruppe gegenüber der ischämischen Kontrollgruppe um circa 5%, was einer Zunahme des Ausmaßes des Gewebeödems der Darmwand durch Glycin entspricht (Gesamtmittelwerte: I, Kontrolle: $-77,5 \pm 1,4\%$; I, Glycin: $-81,5 \pm 0,8\%$). Bei dem Vergleich der I/R-Gruppen bot sich kein signifikanter Unterschied durch Glycin.

In Serie 2 hatte Glycin keinen signifikanten Effekt auf den Flüssigkeitsgehalt des Dünndarmgewebes (graphisch nicht gezeigt).

Insgesamt förderte Glycin somit die Gewebeödembildung während einer längeren ischämischen Phase (60 Minuten, Serie 1), hatte jedoch während einer kurzen Ischämiephase (10 Minuten, Serie 2) und der Reperfusion keinen signifikanten Effekt auf die Gewebeödembildung.

3.3.4 Einfluss auf die makroskopisch quantifizierte Schädigung

Der makroskopische Score des Dünndarms der normoxischen Kontrollgruppe betrug am Ende des Versuches $0,04 \pm 0,03$ AU (Serie 1; Mittelwert der Scores der Segmente 3, 6, und 9; s. Abb. 14a). Nach 60 Minuten Ischämie lag der Makroscore der ischämischen Kontrollgruppe deutlich und signifikant höher bei $2,94 \pm 0,49$ AU. Während der 120-minütigen Reperfusion stieg der Score weiter an (I/R, Kontrolle: $3,25 \pm 0,37$ AU). Glycin bewirkte in der ischämischen Phase eine tendenziell (nicht signifikant) niedrigere Einblutung in die Darmwand (I, Glycin: $1,98 \pm 0,28$ AU). Dieser Effekt von Glycin war am Ende der Reperfusion im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe signifikant (I/R, Glycin: $1,9 \pm 0,21$ AU).

Bei den Versuchen mit den isolierten Dünndarmsegmenten (Serie 2) betrug der Makroscore der Kontrollgruppe nach 10 min Ischämie lediglich $0,23 \pm 0,02$ AU (s. Abb. 14b). Glycin hatte während dieser kurzen ischämischen Phase keinen Effekt auf den niedrigen Makroscore der isolierten Dünndarmsegmente (I, Glycin: $0,21 \pm 0,05$ AU).

Insgesamt hatte Glycin tendenziell (signifikant nach der Reperfusionsphase in Serie 1) einen Schutzeffekt bezüglich der makroskopisch quantifizierten Schädigung.

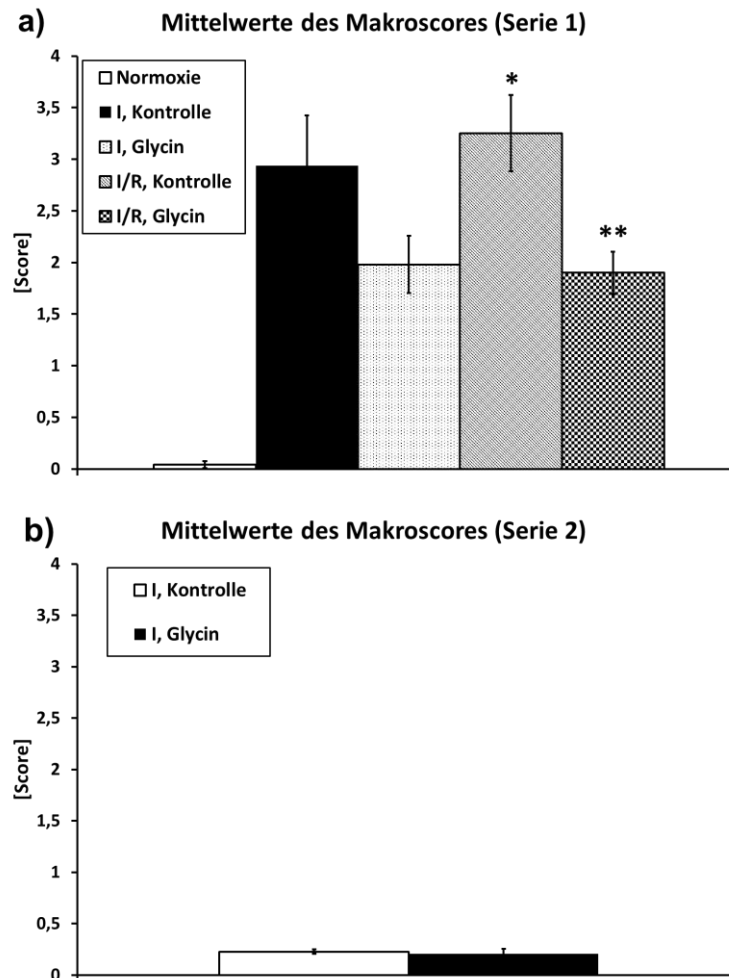


Abbildung 14: Effekte von Glycin auf die makroskopisch quantifizierte Schädigung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion: a) Mittelwerte des Makroscores der ausgelagerten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 1), b) Mittelwerte des Makroscores der isolierten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 2).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Ischämie der drei isolierten Dünndarmsegmente wurde 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Der Makroscore wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert. Je höher der Makroscore ist, desto höher ist die Einblutung ins Gewebe.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: n=4; I, Kontrolle und I, Glycin: n=6; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7). *p < 0,05 gegenüber der Normoxiegruppe, **p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

3.3.5 Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes

Bei der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse der ausgelagerten Dünndarmsegmente (Serie 1) lag der durchschnittliche Hämoglobingehalt der Dünndarmwand der Normoxiegruppe bei $0,78 \pm 0,06 \mu\text{mol/cm}$ (s. Abb. 15a). Die mesenteriale Ischämie bewirkte einen deutlichen, aufgrund der Streuung der Einzelergebnisse in der ischämischen Kontrollgruppe allerdings nicht signifikanten, Anstieg des Hämoglobingehaltes des Dünndarmgewebes (I, Kontrolle: $4,02 \pm 1,29 \mu\text{mol/cm}$). Durch die Reperfusion stieg der Blutgehalt des Darmgewebes nicht weiter an (I/R, Kontrolle: $3,74 \pm 0,65 \mu\text{mol/cm}$). Glycin hatte weder in der ischämischen Phase noch in der Reperfusionphase einen Effekt auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes (I, Glycin: $3,74 \pm 0,88 \mu\text{mol/cm}$; I/R, Glycin: $3,95 \pm 0,84 \mu\text{mol/cm}$).

Wie in Serie 1 hatte Glycin auch in Serie 2 keinen Effekt auf den durchschnittlichen Hämoglobinwert des Dünndarmgewebes (s. Abb. 15b). Allerdings war bei der Einzelbetrachtung des Dünndarmsegments 3 der Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes in der Glycingrouppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 15c; Darmsegment 3: I, Glycin: $0,96 \pm 0,09 \mu\text{mol/cm}$; I, Kontrolle: $1,43 \pm 0,14 \mu\text{mol/cm}$). Die allgemein niedrigeren gemessenen Hämoglobinwerte der Serie 2 gegenüber der Serie 1 können durch den Blutverlust beim Abschneiden der Gefäße erklärt werden (s. Abb. 15a/b; s. Kapitel 2.2.4.3).

Mit Ausnahme des Schutzeffektes von Glycin in Dünndarmsegment 3 der Serie 2 hatte Glycin keinen Effekt auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes.

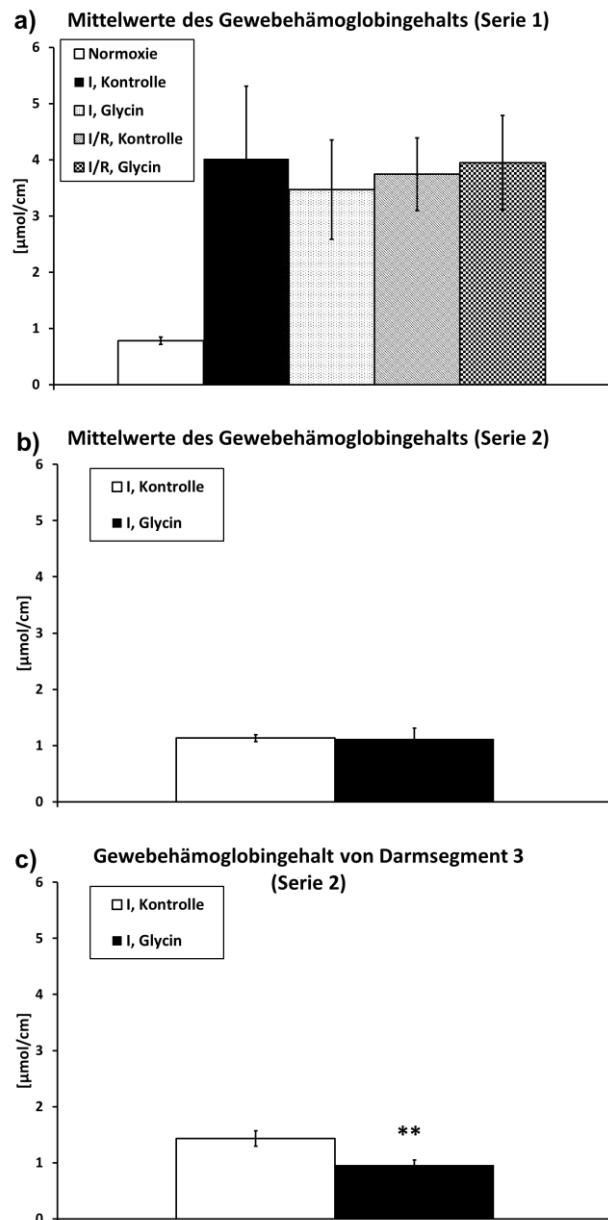


Abbildung 15: Effekte von Glycin auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion: a) Mittelwerte des Gewebehämoglobingehalts der ausgelagerten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 1), b) Mittelwerte des Gewebehämoglobingehalts der isolierten Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 (Serie 2), c) Gewebehämoglobingehalt des isolierten Dünndarmsegments 3 (Serie 2).

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Ischämie der drei isolierten Dünndarmsegmente wurde 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW \times h⁻¹ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Der freie Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: n=4; I, Kontrolle und I, Glycin: n=6; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7). **p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

3.3.6 Einfluss auf die funktionelle Integrität des Dünndarms

Da die Glukosebildung infolge der Spaltung von Saccharose durch die Saccharaseaktivität der Dünndarmhomogenate bezogen auf die einzelnen Segmente stark unterschiedlich war, erfolgt hier eine Einzelbetrachtung der Segmente (s. Abb. 16a-c). In der normoxischen Versuchsgruppe wurde in Segment 3 mit $59,30 \pm 3,73 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten die höchste Glukosebildung und somit die höchste Saccharaseaktivität gemessen. In Segment 6 fand mit $50,89 \pm 4,50 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten eine etwas geringere und in Segment 9 mit $7,33 \pm 1,92 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten eine deutlich geringere Glukosebildung pro Zeit statt. Die mesenteriale Ischämie bewirkte eine signifikante Abnahme der Glukosebildung in allen drei Dünndarmbereichen. In den Dünndarmsegmenten 3 und 6 fiel die Glukoseproduktion auf circa 60% des normoxischen Kontrollwertes und in Dünndarmsegment 9 auf circa 30% des normoxischen Kontrollwertes ab (I, Kontrolle: Darmsegment 3: $34,94 \pm 2,59 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; Darmsegment 6: $31,34 \pm 2,07 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; Darmsegment 9: $2,76 \pm 0,50 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten). Infolge der Reperfusion nahm die Glukosebildung weiter ab. In Dünndarmsegment 3 fiel die Glukoseproduktion auf unter 1% des normoxischen Kontrollwertes und in Dünndarmsegment 6 und 9 auf circa 10% des normoxischen Kontrollwertes ab (s. Abb. 16a-c). Außer im Dünndarmsegment 3 in der ischämischen Kontrollgruppe bewirkte Glycin sowohl in der Ischämie als auch in der Reperfusion tendenziell eine höhere Glukosebildung in den Dünndarmsegmenten. In der Reperfusion in Dünndarmsegments 9 war die Glukosebildung der Glycingruppe gegenüber derer der Kontrollgruppe signifikant höher (Darmsegment 9: I/R, Kontrolle: $0,71 \pm 0,15 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; I/R, Glycin: $1,05 \pm 0,22 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten).

Bei der Auswertung der Versuche der isolierten Dünndarmsegmente (Serie 2) fanden sich ähnliche Ergebnisse (graphisch nicht dargestellt). Allgemein nahm die Glukosebildung der Dünndarmsegmente von proximal nach distal ab (I, Kontrolle: Darmsegment 3: $44,62 \pm 4,38 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; Darmsegment 6: $22,54 \pm 2,12 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; Darmsegment 9: $2,02 \pm 0,89 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten). Glycin bewirkte wie in Serie 1 in Dünndarmsegment 3 eine minimal niedrigere und in den Dünndarmsegmenten 6 und 9 eine etwas höhere Glukosebildung (nicht signifikant; I, Glycin: Darmsegment 3: $43,47 \pm 7,18 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten; Darmsegment 6: $32,33 \pm 6,15 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten, Darmsegment 9: $3,62 \pm 1,19 \text{ mg/dl} \times \text{cm}^{-1}$ in 30 Minuten).

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse dieses Assays dafür sprechen, dass das Vorkommen des Enzyms Saccharase im Bürstensaum des Dünndarms nach distal hin abnimmt. Insgesamt hatte Glycin am ehesten einen positiven (=schützenden) Effekt auf die Glucosebildung und damit auf die funktionelle Integrität des Dünndarms.

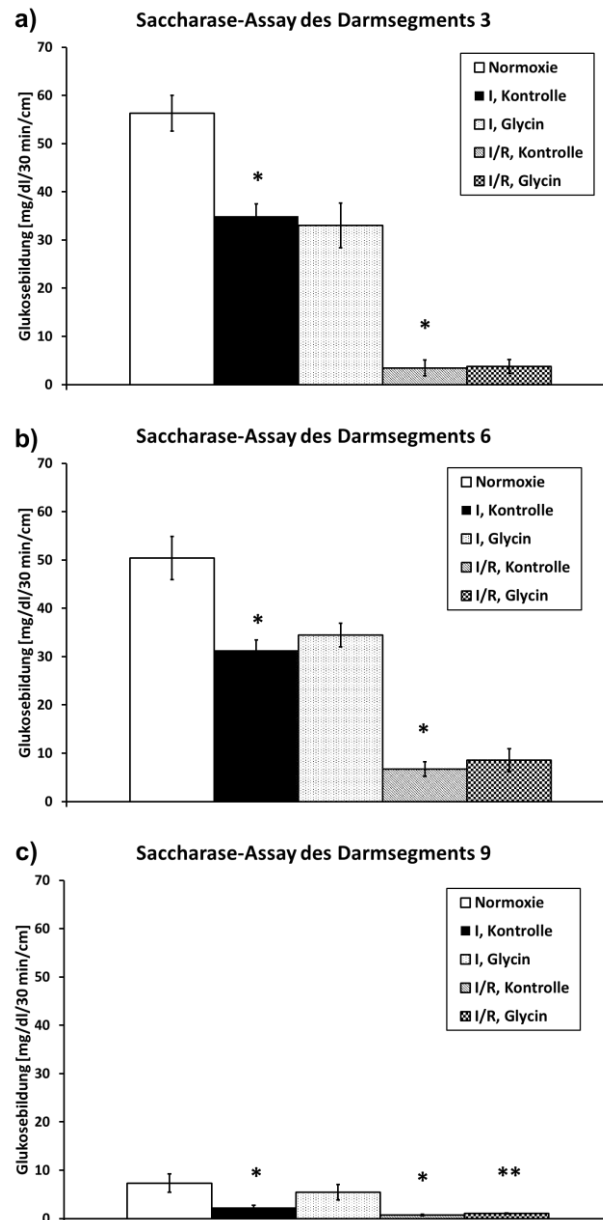


Abbildung 16: Effekte von Glycin auf die Saccharase-Aktivität als Maß der funktionellen Integrität der ausgelagerten Dünndarmsegmente der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion (Serie 1): a) Saccharase-Assay des Darmsegments 3, b) Saccharase-Assay des Darmsegments 6, c) Saccharase-Assay des Darmsegments 9.

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen. Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. Glycin wurde in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW $\times h^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) infundiert. Die Saccharase-Aktivität des Dünndarmgewebes wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert. Je höher die Glukosebildung ist, desto ist höher ist die funktionellen Integrität des Dünndarms.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I, Kontrolle und I, Glycin: $n=6$; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe, ** $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

3.3.7 Einfluss auf die Präsenz neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe

Die Einzelergebnisse des Dünndarmsegments 3 der Serie 1 sind aufgrund der hohen Standardfehler nicht interpretierbar und werden daher nicht dargestellt. In der Abbildung 17c sind die Ergebnisse des Segments 3 allerdings enthalten, da sie die Gesamtaussage nicht verändern.

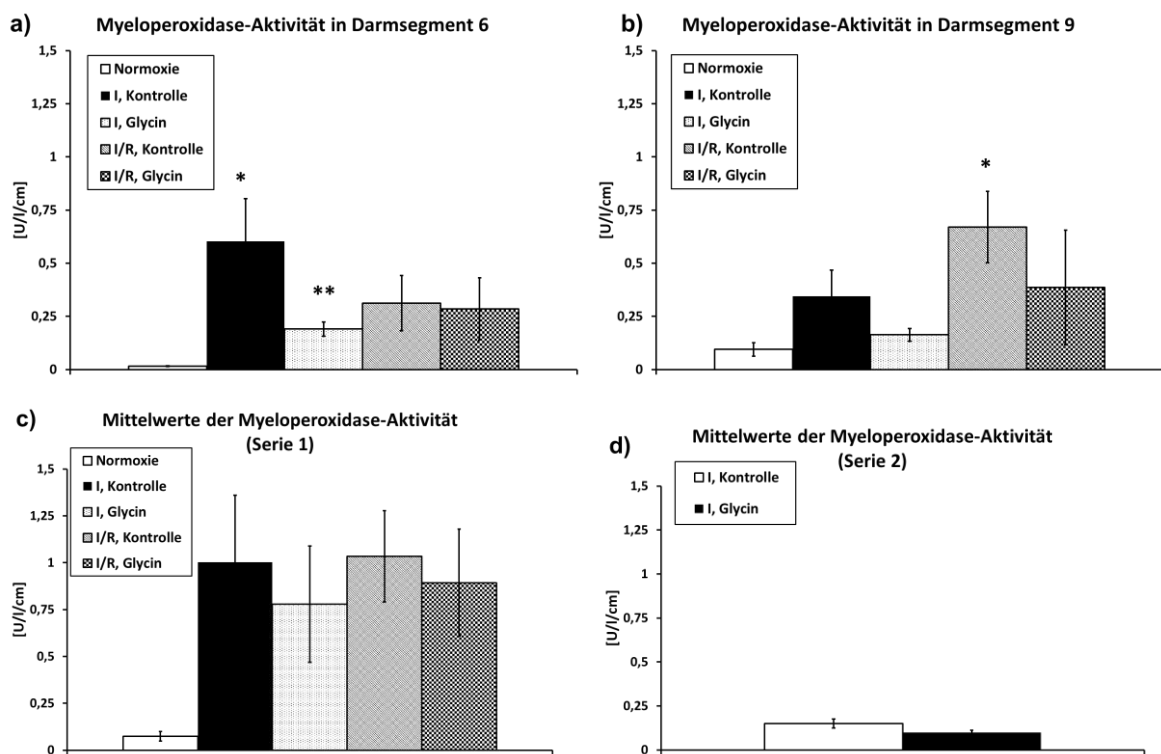


Abbildung 17: Effekte von Glycin auf die Myeloperoxidase-Aktivität als Maß für die Präsenz neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion: a) Myeloperoxidase-Aktivität im ausgelagerten Darmsegment 6 (Serie 1), b) Myeloperoxidase-Aktivität im ausgelagerten Darmsegment 9 (Serie 1), c) Gesamtmittelwerte der Myeloperoxidase-Aktivität der drei ausgelagerten Dünndarmsegmente in Serie 1, d) Gesamtmittelwerte der Myeloperoxidase-Aktivität der drei isolierten Dünndarmsegmente in Serie 2.

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Ischämie der drei isolierten Dünndarmsegmente wurde 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Die Myeloperoxidase-Aktivität des Dünndarmgewebes, ein Maß für die Präsenz neutrophiler Granulozyten, wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM (Normoxie: n=4; I, Kontrolle und I, Glycin: n=6; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: n=7). *p < 0,05 gegenüber der Normoxiegruppe, **p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

Die durchschnittliche Myeloperoxidase-Aktivität im Dünndarmgewebe der normoxischen Versuchsgruppen lag in Serie 1 bei $0,07 \pm 0,03 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$ (s. Abb. 17c). Die mesenteriale Ischämie bewirkte in der ischämischen Kontrollgruppe in Dünndarmsegment 6 eine signifikante Zunahme der Myeloperoxidase-Aktivität (s. Abb. 17a; Darmsegment 6: I, Kontrolle: $0,60 \pm 0,20 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$). Tendenziell (nicht signifikant) war die Zunahme der Myeloperoxidase-Aktivität auch in Dünndarmsegment 9 und bei der Gesamtbetrachtung zu sehen (s. Abb. 17b/c; Darmsegment 9: I, Kontrolle: $0,34 \pm 0,12 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$). Die Reperfusion bewirkte in Darmsegment 6 tendenziell (nicht signifikant) eine Abnahme und in Darmsegment 9 eine Zunahme der Myeloperoxidase-Aktivität (s. Abb. 17 a/b; Darmsegment 6: I/R, Kontrolle: $0,31 \pm 0,13 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; Darmsegment 9: I/R, Kontrolle: $0,67 \pm 0,17 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$). In der Gesamtbetrachtung hatte die Reperfusion keinen Effekt auf die Myeloperoxidase-Aktivität. In Segment 6 und 9 bewirkte Glycin in der Ischämie und in der Reperfusion eine tendenziell niedrigere Myeloperoxidase-Aktivität. Eine signifikant niedrigere Myeloperoxidase-Aktivität bewirkte Glycin allerdings nur in der ischämischen Kontrollgruppe des Segments 6 (s. Abb. 17a/b; Darmsegment 6: I, Glycin: $0,19 \pm 0,03 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; I/R, Glycin: $0,28 \pm 0,14 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; Darmsegment 9: I, Glycin: $0,16 \pm 0,03 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; I/R, Glycin: $0,39 \pm 0,27 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$).

Bei der Auswertung der Versuche der isolierten Dünndarmsegmente (Serie 2) fanden sich sehr ähnliche Ergebnisse. Glycin bewirkte in allen drei Segmenten tendenziell eine niedrigere Myeloperoxidase-Aktivität (s. Abb. 17d (Gesamtbetrachtung, Einzelergebnisse graphisch nicht gezeigt); Darmsegment 3: I, Kontrolle: $0,25 \pm 0,06 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; I, Glycin: $0,10 \pm 0,01 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; Darmsegment 6: I, Kontrolle: $0,09 \pm 0,01 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; I, Glycin: $0,09 \pm 0,02 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; Darmsegment 9: I, Kontrolle: $0,11 \pm 0,02 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$; I, Glycin: $0,09 \pm 0,01 \text{ U/l} \times \text{cm}^{-1}$).

Als Gesamtergebnis lässt sich festhalten, dass die Glycingabe während der segmentalen absoluten Ischämie und während der nachfolgenden Reperfusion tendenziell (in Darmsegment 6 während der segmentalen absoluten Ischämie signifikant) eine niedrigere Myeloperoxidase-Aktivität bewirkte.

3.3.8 Einfluss auf die mikroskopisch quantifizierte Schädigung

Der durchschnittliche Chiu-Park-Score der normoxischen Gruppe der ausgelagerten Dünndarmsegmente (Serie 1) lag bei $0,05 \pm 0,03 \text{ AU}$. Die mesenteriale Ischämie bewirkte eine signifikant höhere Schädigung (s. Abb. 18a-c; I, Kontrolle: Darmsegment 3: $3,84 \pm 0,47 \text{ AU}$; Darmsegment 6: $3,83 \pm 0,16 \text{ AU}$; Darmsegment 9: $4,87 \pm 0,33 \text{ AU}$). Nach der postischämischen Reperfusion war der Park-Chiu-Scores in Segment 3 und 6 tendenziell niedriger als nach der alleinigen Ischämiephase. In Darmsegment 9 kam es

dagegen zu einem leichten zusätzlichen Anstieg des Park-Chiu-Scores (s. Abb. 18a-c; I/R, Kontrolle: Darmsegment 3: $3,72 \pm 0,43$ AU; Darmsegment 6: $3,00 \pm 0,25$ AU; Darmsegment 9: $4,97 \pm 0,43$ AU).

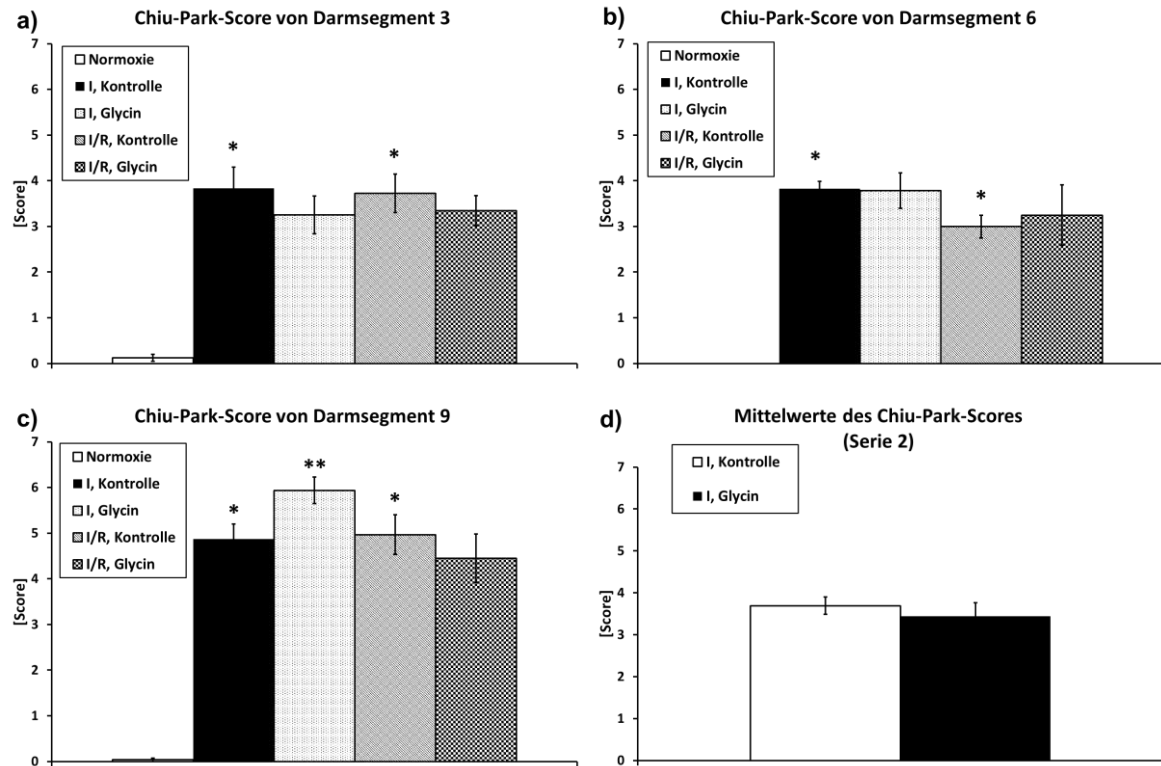


Abbildung 18: Effekte von Glycin auf den Chiu-Park-Score als Maß für die histologisch quantifizierbare Schädigung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion: a) Chiu-Park-Score des ausgelagerten Dünndarmsegments 3 (Serie 1), b) Chiu-Park-Score des ausgelagerten Dünndarmsegments 6 (Serie 1), c) Chiu-Park-Score des ausgelagerten Dünndarmsegments 9 (Serie 1), d) Gesamtmittelwerte des Chiu-Park-Scores der drei isolierten Dünndarmsegmente in Serie 2.

Nach visueller Einteilung des Rattendünndarms in zehn gleich große Segmente wurden die Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 durch Ligaturen und Scherenschnitte von dem restlichen Dünndarm separiert. Die Ischämieinduktion der separierten Segmente 3, 6 und 9 erfolgte durch Abklemmung der drei bis vier zuführenden mesenterialen Gefäße mit Arterienklemmen (Serie 1). Die Ischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Bei einzelnen Versuchsgruppen schloss sich eine Reperusionsphase von 120 Minuten an, die durch das vorsichtige Entfernen der Arterienklemmen induziert wurde. In Serie 2 wurden sowohl die drei Dünndarmsegmente als auch die mesenterialen Gefäße "abgesetzt". Die Ischämie der drei isolierten Dünndarmsegmente wurde 10 Minuten beobachtet. In beiden Serien wurde Glycin in einer Dosierung von $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ ab 30 min vor der Ischämie bis zum jeweiligen Endpunkt der Versuchsgruppe (Serie 1: Ende der Ischämie oder Ende der Reperfusion) bzw. bis zur Separierung der Darmsegmente (Serie 2) infundiert. Der Chiu-Park-Score des Dünndarmgewebes wurde je nach Versuchsgruppe entweder nach der Ischämie oder nach der Reperfusion quantifiziert. Je höher der Chiu-Park-Score ist, desto höher ist die mikroskopische Schädigung des Dünndarmsegments.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Normoxie: $n=4$; I, Kontrolle und I, Glycin: $n=6$; I/R, Kontrolle und I/R, Glycin: $n=7$). * $p < 0,05$ gegenüber der Normoxiegruppe, ** $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe.

Glycin verminderte in keinem Segment signifikant die histologische Schädigung durch die absolute Ischämie oder durch die Reperfusion (s. Abb. 18a-c; Darmsegment 3: I, Glycin: $3,25 \pm 0,41$ AU; I/R, Glycin: $3,35 \pm 0,33$ AU; Darmsegment 6: I, Glycin: $3,79 \pm 0,39$ AU; I/R, Glycin: $3,25 \pm 0,66$ AU; Darmsegment 9: I, Glycin: $5,94 \pm 0,29$ AU; I/R, Glycin: $4,45 \pm 0,53$ AU). In Darmsegment 9 bewirkte Glycin in der Ischämie sogar eine signifikant höhere mikroskopische Schädigung (s. Abb. 18c). Auch bezogen auf die Gesamtmittelwerte der Dünndarmsegmente hatte Glycin keinen signifikanten Effekt (graphisch nicht dargestellt; I, Kontrolle: $4,29 \pm 0,20$ AU; I, Glycin: $4,32 \pm 0,19$ AU; I/R, Kontrolle: $3,61 \pm 0,34$ AU; I/R, Glycin: $3,55 \pm 0,29$ AU).

In allen Segmenten und allen Versuchsgruppen (außer der Normoxiegruppe) war der Großteil der Zotten zerstört und nur kleine Anteile restituiert oder intakt (graphisch nicht dargestellt, in der Regel je < 5%). Der Anteil der restituierten und der intakten Zotten war in allen Segmenten in den Ischämie/Reperfusionsgruppen größer als in den Ischämiegruppen. Bezogen auf alle Darmsegmente wird deutlich, dass die histologische Schädigung während der Reperfusionsphase eher abnahm. Glycin hatte keinen Effekt auf die Zottenzustände in Serie 1 (graphisch nicht dargestellt).

Die Ergebnisse der Versuche der isolierten Dünndarmsegmente (Serie 2) zeigten, dass Glycin in jedem Darmsegment tendenziell (nicht signifikant) die mikroskopische Schädigung vermindert (graphisch nicht dargestellt; Darmsegment 3: I, Kontrolle: $2,21 \pm 0,28$ AU; I, Glycin: $1,85 \pm 0,43$ AU; Darmsegment 6: I, Kontrolle: $4,74 \pm 0,36$ AU; I, Glycin: $3,99 \pm 0,68$ AU; Darmsegment 9: I, Kontrolle: $4,71 \pm 0,27$ AU; I, Glycin: $4,48 \pm 0,23$ AU). Diese Tendenz zeigte sich auch in der Darstellung der Gesamtmittelwerte (s. Abb. 18d; I, Kontrolle: $3,69 \pm 0,21$ AU; I, Glycin: $3,44 \pm 0,32$ AU). Die Schädigung der einzelnen Darmsegmente in Serie 2 war verglichen mit der Schädigung der einzelnen Darmsegmente der Ischämiegruppen der Serie 1 in Darmsegment 3 und 9 tendenziell niedriger und in Darmsegment 6 tendenziell höher. Ebenfalls war der Großteil der Zotten zerstört und nur kleine Anteile restituiert oder intakt (graphisch nicht dargestellt, in Segment 3 je 10-15%, in Segment 6 und 9 je <3%). Glycin hatte auch in Serie 2 keinen Effekt auf die Zottenzustände.

Insgesamt hatte somit die Glycingabe weder während der segmentalen absoluten Ischämie noch während der nachfolgenden Reperfusion einen schützenden Effekt auf die histologisch quantifizierbare Schädigung des Dünndarms, sondern bewirkte während der segmentalen absoluten Ischämie in Darmsegment 9 sogar eine Zunahme der Schädigung.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges und gut reproduzierbares Modell der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms der Ratte etabliert, um potentielle Schutzwirkungen der Aminosäure Glycin auf Parameter der Gewebeschädigung und auf veränderte systemische Parameter infolge der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms untersuchen zu können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Glycin unter *no-flow*-Bedingungen, anders als bei der *low-flow*-Ischämie und Reperfusion, deutlich weniger schützt.

4.1 Das *no-flow*-Tiermodell

Es gibt bereits zahlreiche Tiermodelle der mesenterialen *low-flow*-Ischämie und Reperfusion durch Okklusion der *A. mesenterica superior* (Boorstein, J.M. et al., 1988; Lee, M.A. et al., 2001; Walensi, M. et al., 2013). Nur in wenigen Modellansätzen werden die Kollateralkreisläufe der *A. mesenterica superior* ausgeschaltet. Beispielsweise haben Megison und Kollegen die Kollateralkreisläufe ligiert (Megison, S.M. et al., 1990). Kuzu und Kollegen haben dagegen die einzelne Kollateralkreisläufe mit Hilfe von Gefäßklemmen okkludiert (Kuzu, M.A. et al., 1998). In keinem bekannten Modellansatz wurde tatsächlich eine mesenteriale *no-flow*-Ischämie durch Messungen des Blutflusses nachgewiesen. In den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit zur Etablierung eines Modells der absoluten Ischämie und Reperfusion des Dünndarms der Ratte hatte sich gezeigt, dass eine Okkludierung der *A. mesenterica superior* und aller ihrer Kollateralkreisläufe zeiteffektiv nicht möglich ist. Das verwendete Modell der segmentalen absoluten Ischämie und Reperfusion des Rattendünndarms der vorliegenden Arbeit stellt eine absolute Ischämie durch die Separation von Dünndarmsegmenten und Okkludierung der zuführenden Gefäße sicher. Nur die sichtbaren mesenterialen Gefäße konnten zur Blutversorgung des jeweiligen Dünndarmsegments beitragen. Das verwendete Modell unterbindet effektiv die komplette Blutversorgung des jeweiligen Dünndarmsegments, sogar das Netzwerk von kommunizierenden submukosalen Gefäßen. Dies zeigt der Vergleich der Ergebnisse des Mikrozirkulationsparameters *flow* der Serie 2, in welcher gänzlich vom Tier separierte Darmsegmente untersucht wurden, mit denen der Serie 1, in welcher ausgelagerte Darmsegmente untersucht wurden (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 9). In Serie 1 und 2 wurden während der Ischämie vergleichbare Werte des Blutflusses (unter 3% der Ausgangswerte) gemessen. Das Laserdoppler-Flowmeter O2C misst also bezogen auf den Parameter „relativer mikrovaskulärer Blutfluss“ in der Dünndarmwand minimale Werte trotz einer sichergestellten kompletten Unterbrechung der Blutzufuhr zu den Darmsegmenten (= *no flow*). Die während der ischämischen Phase gemessenen Werte in Serie 1 sind

demnach Leerwerte und entsprechen somit einer absoluten Ischämie (s. Kapitel 3.2.2). Eine andere Erklärung für die gemessenen Werte wären leichte Muskelkontraktionen des Darms.

Bei einer alleinigen Okkludierung der *A. mesenterica superior* besteht weiterhin ein erheblicher Blutfluss in der Dünndarmwand, das bedeutet, dass die Mikrozirkulation vermindert, aber nicht komplett unterbunden wird. Dies wurde in einem *low-flow*-Ischämie-Rattenmodell durch Okkludierung der *A. mesenterica superior* für 90 Minuten von Walensi und Kollegen gezeigt (Walensi, M. et al., 2013). In dem Modell von Walensi und Kollegen wurden im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel 3.2.2) deutlich höhere Werte des Blutflusses (circa 20% des Ausgangswertes) am Ende der Ischämie unter vergleichbaren Bedingungen (Infusion von 0,9%iger Kochsalzlösung, 7 ml/kg x h⁻¹) gemessen. Laut Boley und Kollegen und Granger und Kollegen bedeutet dies, dass trotz Okkludierung der *A. mesenterica superior* eine weitgehend normale Sauerstoffversorgung des Darmgewebes besteht (Boley, S.J. et al., 1978; Granger, D.N. et al., 1980). Allerdings lässt sich diese Aussage anzweifeln, da es bei den Versuchen von Walensi und Kollegen bei einem bestehenden Blutfluss von 20% zu erheblichen Gewebeschäden gekommen ist (Walensi, M. et al., 2013).

Eine kurze Erwähnung muss auch der Mikrozirkulationsparameter „relative Hämoglobinmenge“ finden. Während der Ischämiephase der Serie 2 wurden gegenüber der Serie 1 niedrigere relative Hämoglobinwerte gemessen (s. Kapitel 3.2.2). Dies kann durch den Blutverlust beim Abschneiden der Gefäße in Serie 2 erklärt werden (s. Kapitel 2.2.4.3).

Das Besondere an dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Tiermodell ist, dass die Vitalparameter der Ratten durch das Tiermodell an sich wenig beeinflusst wurden (s. Kapitel 3.2.1), da durch die segmental induzierte Ischämie nur ein kleiner Teil des Darms geschädigt wurde. Eine der wenigen systemischen Auswirkungen war der signifikante Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks in der Reperfusion der I/R-Versuchsgruppe gegenüber der normoxischen Versuchsgruppe (s. Kapitel 3.2.1, Abb. 7). Bei den Versuchstieren, bei denen während der Reperfusion der mittlere arterielle Blutdruck abfiel, wurde die Isoflurankonzentration im Narkosegasgemisch erniedrigt, da sich hohe Isoflurankonzentrationen negativ auf die Herz-Kreislaufsituation auswirken (s. Kapitel 3.2.1). Die systemischen Parameter, beispielsweise die Parameter der Blutgasanalyse und die Plasmaenzymaktivitäten, wurden vom Versuchsaufbau an sich beeinflusst, aber nicht zusätzlich durch die segmental induzierte Ischämie (s. Kapitel 3.2.3). Die Ergebnisse der Normoxiegruppe waren nicht signifikant unterschiedlich zu denen der ischämischen Kontrollgruppe.

Es gibt mehrere Limitationen der vorliegenden Arbeit. Klinisch wird das Krankheitsbild der mesenterialen Ischämie meist erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung diagnostiziert. Mit der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein prophylaktischer Ansatz bezogen auf die Applikation des potentiellen Schutzstoffes Glycin gewählt. Dieser Ansatz kann andererseits bei Hochrisikopatienten vor bestimmten Operationen sinnvoll sein (s. Kapitel 1.1.3). Eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit ist, dass in der Hauptversuchsserie (Serie 1) die Glycingruppen eine minimal höhere Volumenzufuhr erhalten haben (s. Kapitel 2.2.3, Tabelle 4). Dies geschah unbeabsichtigt und da systemische Parameter wie der mittlere arterielle Blutdruck bei diesem Modell eine untergeordnete Rolle spielen, sind Effekte durch die minimal höhere Volumenzufuhr in den Glycin-Gruppen sehr wahrscheinlich vernachlässigbar.

Als Nebenergebnis der vorliegenden Arbeit ist zu erwähnen, dass die Ergebnisse des Saccharase-Assays aussagen, dass nach distal hin das Vorhandensein des Enzyms Saccharase im Bürstensaum des Dünndarms abnimmt. Dies ist typisch für die in der Bürstensaummembran lokalisierten Oligosaccharidasen. Die Konzentration dieser Enzyme ist auch beim Menschen im Jejunum höher als im Ileum (Schmidt, R.F., Thews, G., 1997). Die Konsequenz dieser Beobachtung ist, dass die Aussagekraft der Ergebnisse des Saccharase-Assays für proximale Dünndarmabschnitte der Ratte größer ist als für distale. Insgesamt lässt sich sagen, dass das *no-flow*-Modell der vorliegenden Arbeit ein neuartiges und gut reproduzierbares Modell der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms der Ratte ist, in welchem Effekte auf systemische Parameter eine untergeordnete Rolle spielen.

4.2 Die intestinale Ischämie- und Reperfusionsschädigung im *no-flow*-Modell

Die Ischämie- und Reperfusionsschädigung des Dünndarms durch das Tiermodell der vorliegenden Arbeit mit 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion (Serie 1) war bezüglich der Gewebeschädigungsparameter größer als in dem bereits erwähnten vergleichbaren *low-flow*-Ischämie-Modell (90 Minuten Ischämie, 120 Minuten Reperfusion) von Walensi und Kollegen (s. Kapitel 3.3; Walensi, M. et al., 2013). Beispielsweise war die makroskopisch quantifizierte Schädigung des gesamten Dünndarms in der I/R-Kontrollgruppe der Versuche von Walensi und Kollegen mit 1,4 AU deutlich niedriger als in der I/R-Kontrollgruppe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Tiermodells mit durchschnittlich $3,75 \pm 0,37$ AU der drei Dünndarmsegmente bei vergleichbaren Ergebnissen der normoxischen Versuchsgruppen (s. Kapitel 3.3.4; Walensi, M. et al., 2013). Auf eine niedrigere I/R-Schädigung des Dünndarms des Modells von Walensi und Kollegen weisen auch andere Parameter wie der Gehalt von freiem

Hämoglobin des Dünndarmgewebes, die Präsenz neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe und die mikroskopisch quantifizierte Schädigung hin (s. Kapitel 3.3.5/7/8; Walensi, M. et al., 2013). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die *no-flow*-Ischämie-Reperfusionsschädigung trotz kürzerer Ischämiephase größer ist als die *low-flow*-Ischämie-Reperfusionsschädigung. Ein Grund hierfür könnte die trotz der Ischämie noch bestehende Sauerstoffversorgung durch den Blutfluss in den Kollateralen (circa 20% des Ausgangsblutflusses) sein (s. Kapitel 4.1). Allerdings haben Petrat und Kollegen im gleichen Tiermodell wie Walensi und Kollegen eine makroskopisch quantifizierte Schädigung von durchschnittlich circa 3,8 AU der drei Dünndarmsegmente 3, 6 und 9 in der ischämischen Kontrollgruppe und somit eine vergleichbar hohe Schädigung wie in der ischämischen Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit beobachtet (s. Kapitel 3.3.4; Petrat, F. et al., 2010). Dies zeigt, dass die absolute Schädigung zusätzlich zum Versuchsaufbau vom Experimentator abhängig ist und somit schwer vergleichbar ist. Beim Vergleich der Ergebnisse der Mikrozirkulationsparameter von Walensi und Kollegen mit denen der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass im vorliegenden Modell nicht nur der Blutfluss in der Ischämie, sondern auch in der Reperfusion niedriger ist (s. Kapitel 3.2.2; Walensi, M. et al., 2013). Am Ende der 120-minütigen Reperusionsphase erreichte der Blutfluss im Modell von Walensi und Kollegen circa 75% der Ausgangswerte (Walensi, M. et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit erreichte der Blutfluss dagegen nur etwa 40% der Ausgangswerte (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 9). Der in dem Modell von Walensi und Kollegen höhere Blutfluss während der Ischämie könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der Ischämie mehr Kapillaren geöffnet waren und dementsprechend auch mehr Kapillaren in der Reperfusion durchgängig gewesen seien könnten. Allerdings kann man diese Aussage nicht durch die Messungen des Laserdoppler-Flowmeters O2C bestätigen, da eine andere Erklärung der Messunterschiede des Flowmeters wäre, dass das Blut langsamer durch die Kapillaren floss. Allgemein lässt sich aber ein verminderter Blutfluss in der Reperusionsphase durch das *no-reflow*-Phänomen erklären. Menger und Kollegen zeigten in einem I/R-Modell des Skelettmuskels, dass nach einer Zeitdauer von 30 Minuten postischämischer Reperfusion 60-70% der Kapillaren nicht wiederdurchblutet wurden, was sich mit den Ergebnissen der im Rahmen des vorliegenden Arbeit etablierten Tiermodells deckt (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 9; Menger, M.D. et al., 1992). Als mögliche Ursachen der verminderten Wiederdurchblutung der Kapillaren nennen Menger und Kollegen Thrombosen der Mikrogefäße, Verstopfung der Kapillaren durch Leukozyten, Anschwellen der Endothelzellen der Kapillaren, Beeinträchtigung des mikrovaskulären Blutfließvermögens und Erhöhung des hydraulischen Widerstandes (Menger, M.D. et al., 1992). Die verminderte Wiederdurchblutung der Kapillaren erklärt auch die niedrigeren Sauerstoffsättigungen des Hämoglobins von circa 50% der Ausgangswerte in der

Reperfusion, da die verminderte Wiederdurchblutung der Kapillaren eine erhöhte Sauerstoffausschöpfung bedingt (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 8). Auch eine länger andauernde Ischämie bedingt eine höhere Sauerstoffausschöpfung. Beim Vergleich der Ergebnisse der Sauerstoffsättigungen der Serie 1 und 2 in der Ischämie fällt auf, dass im Verlauf der 60-minütigen Ischämie (Serie 1) mehr Sauerstoff verbraucht wurde als während der 10-minütigen Ischämie (Serie 2; s. Kapitel 3.2.2, Abb. 8).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Reperfusion eine deutliche Erhöhung des gesamten Flüssigkeitsgehaltes der Darmsegmente, also der nicht resorbierten Flüssigkeit im Darmlumen und den Gewebeödemen in der Darmwand, bedingt (Parameter „Dünndarmgewicht“; s. Kapitel 3.3.1, Abb. 11). Eine Erklärung für die Erhöhung des Flüssigkeitsgehaltes der Darmsegmente ist ein erhöhter Flüssigkeitseinschuss in das Darmlumen, welcher durch eine gestörte Kapillarpermeabilität bedingt sein könnte. Dass die Reperfusion eine gestörte Kapillarpermeabilität verursacht, beschrieben Granger und Kollegen bereits 1986 (Granger, D.N. et al., 1986). Als Folgen der gestörten Kapillarpermeabilität nennen sie erhöhte transkapilläre Filtration, intestinale Ödeme und Flüssigkeitsbewegungen ins Darmlumen. Eine andere Erklärung für die Erhöhung des Flüssigkeitsgehaltes der Darmsegmente ist eine verminderte Flüssigkeitsresorption durch die geschädigten Dünndarmwände und die Entstehung von Gewebeödemen.

Von dem Parameter „Dünndarmgewicht“ ist der Parameter „Nass-Trockengewicht“ abzugrenzen. Dieser Parameter misst ausschließlich die Ödeme des Darmgewebes. Ödeme sind pathologische Ansammlungen von Flüssigkeit im Interstitium, den alle Zellen unmittelbar umgebenden Flüssigkeitsraum, oder in den Zellen (Schmidt, R.F., Thews, G., 1997). Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen eine Zunahme der Gewebeödeme in den Dünndarmwänden der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und anschließender Reperfusion, also eine Zunahme der Gewebeschädigung durch die Reperfusion (s. Kapitel 3.3.3, Abb.13). Das Phänomen, dass die Gewebeschädigung durch die Reperfusion paradoxerweise zunehmen kann („Sauerstoffparadoxon“), wurde schon 1985 von McCord geschildert (McCord, J.M., 1985). Wenn die Ergebnisse der Normoxie- und Ischämie-Versuchsgruppen für den Zeitraum der Ischämiephase der Serie 1 (Messungen am ausgelagerten Darm) miteinander verglichen werden, lässt sich feststellen, dass das Ausmaß der Gewebeödeme der ischämischen Kontrollgruppen gegenüber der Normoxiegruppe signifikant größer war (s. Kapitel 3.3.3, Abb. 13). Da es sich in der vorliegenden Arbeit um ein Modell der absoluten Ischämie handelt, kann die Flüssigkeit, die zu den Gewebeödemen führte, nicht aus den zuführenden Gefäßen stammen, da nachweislich in der Ischämiephase kein Blutfluss mehr bestand. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Flüssigkeit, die zu den Ödemen führte, aus dem Darmlumen resorbiert wurde. Allerdings lässt sich die Aussage nicht belegen.

Die für den Assay der gewichtsabhängigen Längenänderung des postischämischen Dünndarms verantwortliche Pathophysiologie wird von den beiden genannten Parametern „Dünndarmgewicht“ und „Nass-Trockengewicht“ beeinflusst. Die Beobachtung, dass bei den I/R-Versuchsgruppen der Serie 1 ein beträchtlicher Flüssigkeitseinstrom ins Darmlumen bestand, spielt eine große Rolle (s. Kapitel 3.3.1/3). Bei der Durchführung des Assays der gewichtsabhängigen Längenänderung des postischämischen Dünndarms waren nämlich die Ligaturen an den Enden der Dünndarmsegmente noch vorhanden (s. Kapitel 2.2.6.2). Der Flüssigkeitseinstrom in das Lumen der einzelnen Darmsegmente, insbesondere in der Reperfusion, erhöhte somit den hydrostatischen Druck in den Darmsegmenten. Der erhöhte hydrostatische Druck bedingte eine Vordehnung der *Tunica muscularis* des Darmgewebes. Das bedeutet, dass Muskelzellen passiv angespannt werden. Die passive Anspannung bestimmt, wie viel Kraft ein Muskel bei der jeweiligen Länge zusätzlich entwickeln kann (Schmidt, R.F., Thews, G., 1997). Diese Gesetzmäßigkeit darf bei der Beurteilung der gewichtsabhängigen Längenänderung des postischämischen Dünndarms als Maß der Schädigung der *Tunica muscularis* nicht vernachlässigt werden (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 12). Die Ausgangsannahme für den Assay der gewichtsabhängigen Längenänderung des postischämischen Dünndarms, dass je kleiner die prozentuale Längenzunahme durch die Gewichte ist, desto weniger die *Tunica muscularis* geschädigt ist, lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Vordehnungen der *Tunicae musculares* und der somit resultierenden unterschiedlichen isometrischen Kontraktionsmaxima nicht ohne Weiteres aufrechterhalten. Bei den Versuchen mit den ausgelagerten Dünndarmsegmenten (Serie 1) hätte unter dieser Ausgangsannahme die normoxische Versuchsgruppe die am meisten geschädigte *Tunica muscularis*, da in dieser Versuchsgruppe die größte Längenzunahme der einzelnen Darmsegmente zu verzeichnen war (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 12a). Die allgemein niedrigeren prozentualen Längenzunahmen der Reperfusionsgruppen können auf die obengenannte Muskel-Vordehnung zurückgeführt werden. Die Vordehnung der I/R-Versuchsgruppen ist also bei der Bewertung der Ergebnisse des Assays der Längenänderung durch Gewichte zu beachten, da sonst die Ergebnisse für eine Abnahme der Schädigung der *Tunica muscularis* durch die Reperfusion sprechen würden (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 12). Um eine valide Aussage über die Muskelschädigung zu erhalten, müsste die Methode der gewichtsabhängigen Längenänderung des postischämischen Dünndarms bei zukünftigen Versuchen modifiziert werden. Beispielsweise könnten Messungen nach Entfernung der Ligaturen an den Enden der Dünndarmsegmente sinnvoll sein, da die Muskel-Vordehnung, wenn sie nicht so extrem war, dass die Muskelschicht gänzlich zerstört wurde, aufgehoben wird.

Die Ergebnisse des Makroscores und des Saccharase-Assays sprechen für eine weitere Schädigung des Dünndarms durch die Reperfusion (s. Kapitel 3.3.4/6, Abb. 14/16). Die

makroskopisch quantifizierte Schädigung bei den Versuchen mit den ausgelagerten Darmsegmenten (Serie 1) war in der I/R-Kontrollgruppe größer als in der Ischämie-Kontrollgruppe (s. Kapitel 3.3.4, Abb. 14). Ebenso war die Glukosebildung der I/R-Kontrollgruppe der Versuche der Serie 1 deutlich niedriger als die der Ischämiegruppe, was einer weiteren Zerstörung des Bürstensaums durch die Reperfusion entspricht (s. Kapitel 3.3.6, Abb. 16).

Nicht alle Ergebnisse der Versuche der ausgelagerten Darmsegmente (Serie 1) weisen auf eine Zunahme der Schädigung durch die Reperfusion hin. Bei der Auswertung des Soret-Assays, über welchen das freie Hämoglobin und somit ein Maß für eine Gewebeeinblutung quantifiziert wurde, zeigten sich vergleichbar hohe Werte der Ischämie- und der I/R-Gruppen, was einer gleich großen Schädigung entsprechen würde (s. Kapitel 3.3.5, Abb. 15). Die Ergebnisse des Makroscores und des Soret-Assays sind also nicht einheitlich. Ein Grund könnte sein, dass bei der spektroskopischen Quantifizierung des Blutes im Gewebe (Soret-Assay) Blut nachgewiesen wurde, welches bei der visuellen Graduierung der Einblutung (Makroscore) nicht als Schädigung angesehen wurde.

Bei der Bewertung der Myeloperoxidase-Aktivität, welche ein Maß für die Präsenz neutrophiler Granulozyten ist, kann aufgrund hoher Standardfehlerwerte keine valide Aussage zum Unterschied der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion gemacht werden (s. Kapitel 3.3.7, Abb. 17). Normalerweise nimmt die Präsenz der neutrophilen Granulozyten in der Reperfusion zu und verstärkt die inflammatorische Reaktion (s. Kapitel 1.3.1). Die inflammatorische Gewebereaktion wiederum ist eine Voraussetzung für die Regeneration von geschädigtem Gewebe (Petrat, F. et al., 2012).

Die einzigen Ergebnisse, die der Aussage der Zunahme der Gewebeschädigung durch die Reperfusion tatsächlich widersprechen, sind die Ergebnisse des Chiu-Park-Scores der ausgelagerten Darmsegmente in Serie 1 (s. Kapitel 3.3.8, Abb. 18). In den Dünndarmsegmenten 3 und 6 verminderte die Reperfusion minimal die histologische Schädigung. In Dünndarmsegment 9 bewirkte die Reperfusion jedoch eine geringe Erhöhung der histologischen Schädigung, was bedeutet, dass die Reperfusion die histologisch erfassbare Gewebeschädigung minimal verstärkt hat. Dagegen war der Anteil der restituierten und der intakten Zotten in allen Segmenten in den I/R-Kontrollgruppen größer als in den Ischämiegruppen, was für eine Regeneration der Zotten während der Reperfusion spricht. Dass die post-ischämische Regeneration nicht durch alle Schädigungsparameter erfasst wurde, könnte an der unterschiedlich langen Dauer der Regenerationszeit der einzelnen Schädigungsparameter liegen. Beispielsweise müssten beim Parameter „Makroscore“ die Einblutungen abgebaut werden, um eine Regeneration anhand eines verminderten Makroscores nachweisen zu können.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des *no-flow*-Ischämie-Reperfusions-Modells der vorliegenden Arbeit dafür sprechen, dass die *no-flow*-Ischämie-Reperfusion zu einer stärkeren Schädigung des Dünndarms führt als eine *low-flow*-Ischämie-Reperfusion. Die Ergebnisse stützen größtenteils das allgemein anerkannte *Reflow*-Paradoxon, dass die Gewebeschädigung durch die Reperfusion paradoxerweise zunimmt. Die Ergebnisse untermauern auch das *no-reflow*-Phänomen, dass in der Reperfusion die Kapillaren vermindert wiederdurchblutet werden.

4.3 Glycin als Schutzstoff der absoluten intestinalen Ischämie und Reperfusion

Bisher wurde nicht untersucht, ob und wie Glycin in einem *in vivo*-Modell der absoluten Ischämie vor der Ischämie- und/oder Reperfusionsschädigung des Darms schützt. Von Interesse sind solche Untersuchungen, da vermutlich andere Schädigungsmechanismen als in einem *low-flow*-Modell eine Rolle spielen und somit verschiedene potentielle Schutzmechanismen in den unterschiedlichen Ischämie-Modellen zum Tragen kommen. Beispielsweise kommt es in einem *low-flow*-Ischämie-Modell vermutlich schon während der Ischämie zur Bildung von freien Radikalen und Glycin kann die Entstehung der freien Radikale durch seine antiinflammatorische Eigenschaft vermindern (s. Kapitel 1.3.1; Zhong, Z. et al., 2003). Es ist bisher unklar, ob und wie Glycin bei einer kompletten Ischämie schützt.

Um Glycin als Schutzstoff in der absoluten Ischämie und Reperfusion beurteilen zu können, muss zunächst die Höhe der verabreichten Glycindosis im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ($20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ Glycin) betrachtet werden. Zum Zeitpunkt der Induktion der absoluten Ischämie war den Ratten über eine Zeitdauer von 30 Minuten dementsprechend 10 mg/kg KGW Glycin in Serie 1 und 2 infundiert worden (s. Kapitel 2.2.2). Der in Serie 1 gemessene Glycinspiegel lag zum Zeitpunkt des Ischämiebeginns bei circa $440 \mu\text{mol/l}$ Plasma (s. Kapitel 3.2.3, Abb. 10), womit er deutlich über den berichteten physiologischen Glycin-Plasmaspiegeln von 170 bis $330 \mu\text{mol/l}$ Plasma in Tier und Mensch lag (Evins, A.E. et al., 2000; Iresjo, B.M. et al., 2006; Petrat, F. et al., 2011). Petrat und Kollegen haben in einem *low-flow*-Ischämie-Reperfusionsmodell ebenfalls die Glycinspiegel gemessen und die Spiegelbestimmungen von Glycin der Arbeit von Petrat und Kollegen und der vorliegenden Arbeit sind sowohl in den Glycin- als auch in den Kontrollversuchsgruppen vergleichbar (s. Kapitel 3.2.3, Abb. 10; Petrat, F. et al., 2011). In der bereits genannten Arbeit von Petrat und Kollegen wurde gezeigt, dass Glycin in niedrigen Dosierungen, beispielsweise von 10 mg/kg KGW über die Gesamtversuchsdauer, in einem *low-flow*-Modell die Ischämie-Reperfusionsschädigung des Dünndarms vermindert (Petrat, F. et al., 2011). In allen anderen Arbeiten, die protektive Effekte von

Glycin auf die Schädigung durch mesenteriale Ischämie und Reperfusion beschrieben haben, wurden deutlich höhere Glycindosen als $20 \text{ mg/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ Glycin verabreicht (Mangino, J.E. et al., 1996; Iijima, S. et al., 1997; Lee, M.A. et al., 2001; Lee, M.A. et al., 2002; Jacob, T. et al., 2003; Kallakuri, S. et al., 2003). Der Unterschied der vorliegenden Arbeit zu der Arbeit von Petrat und Kollegen (Petrat, F. et al., 2011) ist, dass in einem *low-flow*-Modell auch während der Ischämie Glycin weiterhin den Dünndarm erreichen kann, da trotz Ischämie ein Blutfluss von circa 20% besteht (Walensi, M. et al., 2013; s. Kapitel 4.1). In diesem Zusammenhang ist wichtig zu wissen, dass sich die Glycin-Konzentrationen im Blutplasma und im Extrazellarraum innerhalb von wenigen Minuten angleichen (Hahn, R.G. et al., 1999; Hahn, R.G., 2006). Während der absoluten Ischämie kann in einem *no-flow*-Modell nur das vorab infundierte Glycin wirken, auch wenn der systemische Glycinspiegel durch die kontinuierliche Infusion weiter erhöht wird (s. Kapitel 3.2.3, Abb. 10). Die Halbwertszeit von Glycin im Blut spielt ebenfalls eine Rolle. Sie ist abhängig von der verabreichten Dosis und variiert von circa 30 Minuten bis zu wenigen Stunden (Hahn, R.G., 2006). Das bedeutet, dass möglicherweise schon nach kurzer absoluter Ischämiezeit im Darmgewebe kein Glycin mehr zur Verfügung steht. In der vorliegenden Arbeit kann der durch die fortlaufende Infusion während der absoluten Ischämie erhöhte systemische Glycinspiegel erst im Verlauf der Reperfusion wirken. Dafür spricht, dass Glycin in der Reperfusion verbraucht wird. Während der Reperfusion fällt der Glycinspiegel trotz kontinuierlicher Infusion ab (s. Kapitel 3.2.3, Abb. 10).

Bei der Auswertung der Hauptversuchsserie mit den ausgelagerten Darmsegmenten (Serie 1) zeigte sich, dass die Infusion von Glycin weder während der segmentalen absoluten Ischämie noch während der nachfolgenden Reperfusion einen Effekt auf die Vitalparameter mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur und Sauerstoffsättigung oder die Narkosesteuerung noch auf Parameter der Blutgasanalyse, Plasmaenzymaktivitäten oder andere Aminosäurenkonzentrationen als Glycin im Blut hatte, was aufgrund der nur segmental induzierten mesenterialen Ischämie nicht verwunderlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein kleiner Teil des Darms geschädigt, daher spielen systemische Auswirkungen keine bedeutende Rolle und Glycin als Schutzstoff kann dementsprechend keine systemischen Wirkungen erzielen. Auch in einem Endotoxämie-Modell von Effenberger-Neidnicht und Kollegen zeigten sich keine Schutzeffekte durch Glycin bezüglich der Vitalparameter, der Blutgasanalyse-Parameter und der Plasmaenzymaktivitäten trotz vorhandener Glycinschutzeffekte bei einigen Gewebeschädigungsparametern (Effenberger-Neidnicht, K. et al., 2014). In dem bereits erwähnten *low-flow*-Modell von Petrat und Kollegen dagegen wurde gezeigt, dass Glycin den systemischen Blutdruck in der Reperusionsphase erhöht (Petrat, F. et al., 2011).

Insgesamt betrachtet sprechen die Ergebnisse der Gewebeschädigungsparameter tendenziell für einen Schutzeffekt durch Glycin in der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion, insbesondere während der kurzen 10-minütigen Ischämie (Serie 2).

Die Ergebnisse des Parameters „Dünndarmgewicht“ zeigen eine Erniedrigung des gesamten Flüssigkeitsgehaltes der Darmsegmente, also der nicht resorbierten Flüssigkeit im Darmlumen und den Gewebeödem in der Darmwand, durch Glycin in der Reperfusion (s. Kapitel 3.3.1, Abb. 11). Tendenziell ist dieser Effekt auch im Verlauf der 60-minütigen Ischämie zu sehen. Dies würde einer Verminderung der Störung der Kapillarpermeabilität durch Glycin entsprechen.

Die Ergebnisse des Parameters „Nass-Trockengewicht“ zeigen, dass im Verlauf der langen 60-minütigen Ischämie (Serie 1) die Gewebeödeme infolge der Infusion von Glycin zunehmen (s. Kapitel 3.3.3, Abb. 13). Während einer kurzen Ischämiephase (10 Minuten, Serie 2) und während der Reperfusion dagegen scheinen die Gewebeödeme der Darmwand durch Glycin nicht nennenswert beeinflusst zu werden. Dies könnte dafür sprechen, dass die lange absolute Ischämie von 60 Minuten zu so einer starken Gewebeschädigung führt, dass die verabreichte Glycindosis zum Schutz nicht ausreicht. Bei der durch Glycin verursachten Zunahme der Gewebeödeme während der langen Ischämiephase von 60 Minuten könnte die osmotische Aktivität von Glycin eine Rolle spielen.

Bei dem Parameter „Längenänderung“ zeigten sich Ergebnisse, die die These stützen, dass die lange absolute Ischämie von 60 Minuten zu so einer starken I/R-Schädigung führt, dass die verabreichte Glycindosis zum Schutz nicht ausreicht. Glycin verminderte signifikant in einer kurzen Ischämiephase (10 Minuten, Serie 2) die prozentuale Längenzunahme (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 12). Dagegen konnte nach einer längeren Ischämiephase (60 Minuten, Serie 1) und anschließender Reperusionsphase kein Glycineffekt gezeigt werden. Unter der Annahme, dass je kleiner die prozentuale Längenzunahme durch die Gewichte ist, desto weniger die *Tunica muscularis* geschädigt ist, schützt Glycin vor Schädigung der *Tunica muscularis* während der kurzen Ischämie von 10 Minuten.

Die Ergebnisse des Parameters „Makroscore“, der makroskopisch quantifizierten Schädigung des Dünndarms, sprechen potentiell für einen Schutzeffekt durch Glycin bei deutlicher makroskopisch erfassbarer Dünndarmschädigung (tendenziell nach der 60-minütigen Ischämie, signifikant nach der Reperfusion), was einer verminderten Einblutung in die Darmwand entspricht (Kapitel 3.3.4, Abb. 14). Glycin hatte allerdings während der kurzen 10-minütigen ischämischen Phase keinen Effekt auf den Makroscore. Ein Grund könnte sein, dass während der kurzen Ischämie kaum makroskopisch sichtbare Schädigungen aufgetreten sind.

Bei der Auswertung des Soret-Assays sprechen die Ergebnisse tendenziell für einen Schutzeffekt durch Glycin innerhalb der kurzen Ischämiephase (Serie 2, signifikant in Segment 3), was einem verminderten Gehalt von Hämoglobin im Dünndarmgewebe entspricht (s. Kapitel 3.3.5, Abb. 15). Aussagen zum Glycineffekt während der langen 60-minütigen Ischämiephase und Reperfusion lassen sich aufgrund der großen Streuweite der Messwerte und der daraus resultierenden fehlenden Signifikanz der Ergebnisse der Serie 1 nicht machen.

Die Ergebnisse des Saccharase-Assays sprechen für eine höhere Intaktheit des Bürstensaums der Glycingruppen im Verlauf der kurzen und langen Ischämiephase und während der Reperfusion (signifikant in der Reperfusion in Darmsegment 9, Serie 1) und somit für einen potentiellen Schutzeffekt durch Glycin, insbesondere in den Darmsegmenten 6 und 9 (s. Kapitel 3.3.6, Abb. 16). Kallakuri und Kollegen haben in einem *low-flow-I/R*-Modell ebenfalls beobachtet, dass ein Schutzeffekt von Glycin bei Untersuchung von bestimmten Parametern in einem proximalen Darmsegment im Gegensatz zu weiter distal gelegenen Darmsegmenten nicht ausgebildet gewesen war. Allerdings führten sie dies auf die allgemein geringere Schädigung des proximalen Darmsegments durch das Modell zurück, was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall ist (Kallakuri, S. et al., 2003).

Auf eine verminderte inflammatorische Gewebereaktion deuten die Ergebnisse der Myeloperoxidase-Aktivität der Glycingruppen sowohl innerhalb der kurzen und langen Ischämie als auch während der Reperfusion hin (signifikant in der Ischämie in Darmsegment 6, Serie 1, s. Kapitel 3.3.7, Abb. 17). Dies gibt ein wenig Aufschluss über einen potentiellen Wirkungsmechanismus von Glycin in der *no-flow*-Ischämie und Reperfusion, auf welchen im Verlauf noch eingegangen wird (s. Kapitel 4.4).

Summarisch sprechen die Ergebnisse des Chiu-Park-Scores tendenziell für eine geringe mikroskopisch quantifizierte Schädigung durch Glycin während der kurzen 10-minütigen Ischämie (Serie 2, s. Kapitel 3.3.8, Abb. 18d). Auf die lange Ischämie von 60 Minuten und die anschließende Reperfusion scheint Glycin keinen schützenden Einfluss zu haben (Serie 1, s. Kapitel 3.3.8, Abb. 18a-c). Dagegen bewirkte die Glycingabe während der segmentalen absoluten Ischämie in Darmsegment 9 sogar eine Zunahme der mikroskopisch quantifizierten Schädigung. Ein Grund könnte die bereits angesprochene osmotische Aktivität von Glycin sein.

Auch hatte die Infusion von Glycin weder während der segmentalen absoluten Ischämie noch während der nachfolgenden Reperfusion einen Einfluss auf die Mikrozirkulationsparameter Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobinmenge und Blutfluss in der Dünndarmwand (s. Kapitel 3.2.2). Dagegen haben Mangino und Kollegen in einem Hypothermie-Ischämie-Hundemodell nachgewiesen, dass eine Vorbehandlung mit Glycin

eine höhere Rate des intestinalen Blutflusses und eine erhöhte Sauerstoffaufnahme während der Reperfusion bedingte (Mangino, J.E. et al., 1996).

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse der einzelnen Assays tendenziell für einen Schutzeffekt von Glycin im vorliegenden *no-flow*-Tiermodell der absoluten Ischämie und Reperfusion. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass vor allem im Verlauf einer langen absoluten Ischämiedauer von 60 Minuten und anschließender Reperfusion Glycin seine Schutzwirkung unter *no-flow*-Bedingungen nicht so stark entfalten kann wie unter *low-flow*-Bedingungen.

4.4 Potentielle Schutzmechanismen von Glycin im *no-flow*-Tiermodell

Es gibt bereits zahlreiche Erklärungsversuche der Mechanismen von Glycin, die einen Schutzeffekt in den verschiedensten Schädigungsmodellen bedingen könnten (s. Kapitel 1.4.1). In diesem Abschnitt wird auf die möglichen Mechanismen von Glycin eingegangen, die für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen könnten.

Eine wichtige Rolle des mesenterialen I/R-Schutzeffektes durch Glycin scheint der bereits erwähnte Glycinrezeptor (GlyR, Glycin-gesteuerter Chloridkanal) zu spielen (s. Kapitel 1.4.1). Glycin öffnet den Liganden-gesteuerten Rezeptor und löst dadurch einen Chlorideinstrom in die Zelle aus, was zu einer erhöhten transmembranen Spannungsdifferenz (Hyperpolarisation) führt. Dies verhindert die Exzitation der entsprechenden Zelle, da das spannungsabhängige Öffnen von Calciumkanälen unterdrückt wird. Glycinrezeptoren wurden in der Membran von inflammatorischen Zellen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass der beschriebene Mechanismus die Stimulierung der Synthese von inflammatorischen Substanzen in Makrophagen und Neutrophilen verhindert (Wheeler, M.D. et al., 1999; Zhong, Z. et al., 2003; Gundersen, R.Y. et al., 2005). Auch in der Membran von Endothelzellen, welche eine bedeutende Rolle in der inflammatorischen Gewebereaktion spielen, wurden Glycinrezeptoren nachgewiesen (Zhong, Z. et al., 2003; Gundersen, R.Y. et al., 2005). Das sind also Mechanismen über welche extrazelluläres Glycin, vor allem in der Reperfusion, wirkt. Dies könnte den potentiellen Schutzeffekt in der Reperfusion im *no-flow*-Modell der vorliegenden Arbeit erklären.

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die direkte Zytoprotektion durch Glycin. Eine wahrscheinliche Wirkungsweise scheint das Verhindern der Bildung von nicht-spezifischen Poren zu sein, die sonst die Plasmamembranpermeabilität erhöhen würden (Weinberg, J.M. et al., 1987; Brecht, M., de Groot, H., 1994; Venkatachalam, M.A. et al., 1996; Frank, A. et al., 2000). Die Existenz solcher pathologischen Poren wurde bisher nicht bewiesen. Auch fehlt eine klare Evidenz für die Beteiligung der direkten Zytoprotektion durch Glycin

gegen die I/R-Schädigung unter *in vivo*-Bedingungen (Petrat, F. et al., 2012). Jacob und Kollegen haben in einem *low-flow*-I/R-Modell gezeigt, dass Glycin die Apoptose reduziert durch die Herabregulation von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Caspase-3 und die Hochregulierung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 (Jacob, T. et al., 2003). Howard und Kollegen postulieren dagegen einen anderen Wirkungsmechanismus. Sie ziehen aus den Ergebnissen ihrer Arbeiten den Schluss, dass Glycin das intrazelluläre antioxidative Potential aufrechterhält (Howard, A. et al., 2010). In wie weit diese Mechanismen relevant für einen Schutzeffekt durch Glycin in der *no-flow*-Ischämie sind, lässt sich schwer beurteilen, da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezogen auf die Schädigungsparameter keine einheitliche Aussage erlauben, insbesondere da die histologische Schädigung in Serie 1 nicht durch Glycin vermindert worden ist. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in den Experimenten von Lee und Kollegen und Mangino und Kollegen in *low-flow*-I/R-Modellen auch kein histologischer Schutzeffekt durch Glycin nachgewiesen wurde, obwohl andere Parameter einen Schutzeffekt durch Glycin anzeigten (Mangino, J.E. et al., 1996; Lee, M.A. et al., 2001). Ein Erklärungsansatz dafür ist, dass Glycin lokal die zellulären Membranen stabilisiert und dadurch eine funktionelle Verbesserung schafft ohne signifikante anatomische Verbesserung (Mangino, J.E. et al., 1996).

Dass Glycin in einem *no-flow*-Modell während einer kurzen Ischämiedauer von 10 Minuten (Serie 2) besser schützt, lässt sich dadurch erklären, dass Glycin durch Gewebe, welches bereits geschädigt wurde, weniger aufgenommen wird (Lee, M.A. et al., 2002). Howard und Kollegen haben herausgearbeitet, dass intrazellulär aufgenommenes Glycin bei der Protektion durch Glycin vor mesenterialer I/R-Schädigung von Belang ist. Sie stellten eine klare Abhängigkeit des Schutzeffektes von Glycin zu der GLYT-1 (*glycine transporter-1*)-vermittelten Glycinaufnahme fest (Howard, A. et al., 2010). Das könnte bedeuten, dass im *no-flow*-Modell der vorliegenden Arbeit nur die vor der Ischämie infundierte Glycindosis von 10 mg/kg KGW für den Schutzeffekt während der 60-minütigen Ischämie (Serie 1) eine Rolle spielt. Diese Glycindosis scheint während einer kurzen *no-flow*-Ischämiephase von 10 Minuten (Serie 2) die I/R-Schädigung vermindern zu können. Allerdings gilt dies nicht uneingeschränkt für eine längere Ischämiephase und anschließender Reperfusion. Die lange *no-flow*-Ischämie von 60 Minuten könnte zu einer Glycin-Depletion des Ischämie-betroffenen Gewebes führen und den Wirkungsverlust nach längerer Ischämiezeit erklären. In einem *low-flow*-Ischämie-Modell dagegen kann Glycin das ischämische Gewebe weiterhin erreichen. In verschiedenen nephrologischen I/R-Modellen wurde ebenfalls beobachtet, dass Glycin nur in kurzen Phasen der Ischämie schützt (Heyman, S.N. et al., 1992; Wetzels, J.F. et al., 1993; Yin, M. et al., 2002). Die Gründe diesbezüglich sind den Kollegen allerdings unklar.

Ein anderer Erklärungsansatz dafür, dass Glycin im *no-flow*-Modell der vorliegenden Arbeit nur im Verlauf der kurzzeitigen Ischämie schützt, ist die These, dass Glycin in ATP-depletierten Zellen antagonistisch an den Glycinrezeptoren wirkt (Miller, G.W. et al., 1994). Es könnte sein, dass in *low-flow*-I/R-Modellen die betroffenen Zellen weiterhin ATP zur Verfügung haben, sodass Glycin agonistisch wirken kann und erst nach längerer *no-flow*-Ischämie den Zellen kein ATP mehr zur Verfügung steht. Es wird vermutet, dass, wenn den von Ischämie betroffenen Zellen kein ATP mehr zur Verfügung steht, ein Glycin-sensitiver Anionenkanal (*death channel*) abrupt öffnet und dies zu einem Chlorideinstrom führt, was wiederum zu einem metastabilen Zellzustand führt. Es kommt zur Blasenbildung, Zellschwellung und schließlich zur Membranruptur und zum Zelltod (Nishimura, Y., Lemasters, J.J., 2001).

Ein weiterer Erklärungsansatz dafür, dass Glycin im *no-flow*-I/R-Modell der vorliegenden Arbeit keinen bedeutenden Schutzeffekt auf die mesenteriale I/R-Schädigung hat, wäre, dass durch die lange *no-flow*-Ischämie von 60 Minuten die I/R-Schädigung deutlich stärker ist als in anderen I/R-Modellen (s. Kapitel 4.2, Beispiel: Walensi, M. et al., 2013). Ein direkter Vergleich mit der Ausprägung der mesenterialen I/R-Schädigung in Modellen anderer Arbeitsgruppen als denen des Instituts für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen ist nicht ohne Weiteres möglich, da die Versuchsaufbauten der verschiedenen Arbeitsgruppen voneinander abweichen und andere Schädigungsparameter gemessen werden. Die *no-flow*-Ischämie führt im Gegensatz zu einer *low-flow*-Ischämie möglicherweise zu einer kompletten ATP-Depletion und dadurch könnte es binnen kürzester Zeit zu einem kompletten Integritätsverlust der Zelle kommen. Dafür spricht die verhältnismäßig hohe mikroskopische Schädigung der 10-minütigen *no-flow*-Ischämie (s. Kapitel 3.3.8, Abb. 18). Es könnte sein, dass die relativ gesehen geringe verabreichte Dosis von Glycin den Integritätsverlust der Zellen nicht aufhalten kann.

4.5 Ausblick

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die verabreichte Glycindosis von 20 mg/kg KGW x h⁻¹ während einer absoluten mesenterialen Ischämie von 60 Minuten und anschließender Reperfusion von 120 Minuten die I/R-Schädigung nicht so stark vermindert wie in einem *low-flow*-Ischämie-Modell. Um einen definitiven Schutzeffekt von Glycin in der absoluten Ischämie nachzuweisen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Zum einen könnte die Glycindosis, die vor der Ischämie verabreicht wird, erhöht werden, damit intrazellulär und extrazellulär mehr Glycin zur Verfügung steht. Um die optimale Glycindosis zu finden, die auch in der absoluten Ischämie schützen könnte, könnte der Glycingehalt Ischämie-betroffener Zellen nach

unterschiedlich langen *no-flow*-Ischämiephasen gemessen werden. So könnte der Glycinverbrauch während der *no-flow*-Ischämie quantifiziert werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Glycindosis empirisch auszutesten. Zum anderem könnte die Ischämiezeit des I/R-Modells beispielsweise auf 30 Minuten verkürzt werden, sodass die I/R-Schädigung durch das Modell an sich nicht so hoch ist. Das könnte dazu beitragen, mehr Rückschlüsse auf die Wirkungsmechanismen von Glycin in der *no-flow*-Ischämie zu ziehen. Da die vorliegende Arbeit dem Potential von Glycin als Schutzsubstanz gegenüber mesenterialer Ischämie- und Reperfusionsschädigung nicht widerspricht und die Ergebnisse darauf deuten, dass Glycin auch in einer *no-flow*-Ischämie und nachfolgender Reperfusion bei entsprechender Anpassung des Versuchsaufbaues schützen könnte, könnte die Forschung nach weiteren Versuchen eine klinische Studie zu diesem Thema anstreben. Beispielsweise könnte Glycin prophylaktisch bei operativen Verfahren, die eine vollständige Unterbrechung der Dünndarmperfusion bedingen, wie manche operativen Vorgehensweisen bei einem Aortenaneurysma oder einer Aortendissektion, infundiert werden. Wenn die Infusion von Glycin auch in der Spätphase der Erkrankung die Mortalität des Krankheitsbildes der akuten mesenterialen Ischämie reduzieren würde, würde dies einen enormen Fortschritt in der Therapie dieser meist tödlich verlaufenden Krankheit bedeuten.

5 Zusammenfassung

Die akute mesenteriale Ischämie ist ein meist tödlich verlaufendes Krankheitsbild des klinischen Alltags. Die Aminosäure Glycin ist eine quasi ubiquitär vorkommende einfache Substanz. In vielen experimentellen Tiermodellen wurde demonstriert, dass Glycin die mesenteriale Ischämie- und Reperfusionsschädigung vermindern kann und somit ein potentieller Therapieansatz dieses schwerwiegenden Krankheitsbildes ist. Allerdings wurde dies bisher nur in experimentellen Tiermodellen der sogenannten *low-flow*-Ischämie nachgewiesen, bei der das betroffene Gebiet der Ischämie noch von einem minimalen Blutfluss versorgt wird ohne eine adäquate Sauerstoffversorgung aufrecht zu erhalten. Ob und wie Glycin die Schädigung des Dünndarms durch absolute mesenteriale Ischämie und Reperfusion beeinflusst, ist bisher nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neuartiges und gut reproduzierbares Modell der segmentalen absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms der Ratte etabliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine *no-flow*-Ischämie und Reperfusion zu einer stärkeren Schädigung des Dünndarms führt als eine *low-flow*-Ischämie und Reperfusion. Außerdem unterstützen die Ergebnisse größtenteils das Reflow-Paradoxon, einen pathophysiologischen Aspekt der Mikrozirkulation bei dem die Gewebeschädigung durch die Reperfusion paradoxerweise zunimmt, sowie das *no-reflow*-Phänomen, dass währenddessen die Kapillaren in der Reperfusion vermindert wiederdurchblutet werden. Das Hauptergebnis dieser Arbeit ist, dass die verwendete Glycindosis unter *no-flow*-Bedingungen die Schutzwirkung nicht so entfaltet wie unter *low-flow*-Bedingungen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass es während der langen *no-flow*-Ischämie von 60 Minuten zu einer Glycin-Depletion im Ischämie-betroffenen Gewebe und somit zu einem Wirkungsverlust nach einer längeren Ischämiezeit kommt. In einem *low-flow*-Ischämie-Modell dagegen kann Glycin weiterhin das betroffene Gewebe erreichen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit applizierte Glycindosis könnte daher zu niedrig sein, um einen Schutzeffekt in diesem Tiermodell mit der vergleichsweise hohen Ischämie-Reperfusionsschädigung zu bewirken. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass Glycin in Adenosintriphosphat-depletierten Zellen antagonistisch an den Glycinrezeptoren wirkt. Um einen eventuellen Schutzeffekt von Glycin in der absoluten Ischämie nachzuweisen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Beispielsweise könnte Glycin im Rahmen einer klinischen Studie bei einer Aortenaneurysma-Operation, die eine vollständige Unterbrechung der Dünndarmperfusion bedingt, infundiert werden. Wenn die Infusion von Glycin in der Spätphase der Erkrankung die Mortalität des Krankheitsbildes der akuten mesenterialen Ischämie reduzieren würde, würde dies einen enormen Fortschritt in der Therapie dieser meist tödlich verlaufenden Krankheit bedeuten.

6 Literaturverzeichnis

1. Ascher, E., Hanson, J.N., Cheng, W., Hingorani, A., Scheinman, M. (2001): Glycine preserves function and decreases necrosis in skeletal muscle undergoing ischemia and reperfusion injury. *Surgery* 129(2), 231-235.
2. Association, A.G. (2000): American Gastroenterological Association Medical Position Statement: guidelines on intestinal ischemia. *Gastroenterology* 118(5), 951-953.
3. Berland, T., Oldenburg, W.A. (2008): Acute mesenteric ischemia. *Curr Gastroenterol Rep* 10(3), 341-346.
4. Bobadilla, J.L. (2013): Mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 93(4), 925-940.
5. Boley, S.J., Brandt, L.J., Veith, F.J. (1978): Ischemic disorders of the intestines. *Curr Probl Surg* 15(4), 1-85.
6. Boorstein, J.M., Dacey, L.J., Cronenwett, J.L. (1988): Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. *J Surg Res* 44(5), 555-560.
7. Brecht, M., de Groot, H. (1994): Protection from hypoxic injury in cultured hepatocytes by glycine, alanine, and serine. *Amino Acids* 6(1), 25-35.
8. Bulkley, G.B., Kvietys, P.R., Parks, D.A., Perry, M.A., Granger, D.N. (1985): Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology* 89(4), 852-857.
9. Cerqueira, N.F., Hussni, C.A., Yoshida, W.B. (2005): Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 20(4), 336-343.
10. Chiu, C.J., McArdle, A.H., Brown, R., Scott, H.J., Gurd, F.N. (1970): Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 101(4), 478-483.
11. Cudnik, M.T., Darbha, S., Jones, J., Macedo, J., Stockton, S.W., Hiestand, B.C. (2013): The diagnosis of acute mesenteric ischemia: A systematic review and meta-analysis. *Acad Emerg Med* 20(11), 1087-1100.
12. Dahlqvist, A. (1984): Assay of intestinal disaccharidases. *Scand J Clin Lab Invest* 44(2), 169-172.

13. de Groot, H. (2005): Die Schädigung viszeraler Organe durch Ischämie und Reperfusion. Abläufe in pathogenetischen Netzwerken. Zentralbl Chir 130(3), 202-212.
14. de Groot, H., Rauen, U. (2007): Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. Transplant Proc 39(2), 481-484.
15. Debus, E.S., Diener, H., Larena-Avellaneda, A. (2009): Akute intestinale Ischämie. Chirurg 80(4), 375-385.
16. Debus, E.S., Muller-Hulsbeck, S., Kolbel, T., Larena-Avellaneda, A. (2011): Intestinal ischemia. Int J Colorectal Dis 26(9), 1087-1097.
17. Drosdowski, G., Köster, R., Müller, W. (1977): Duden: Das grosse Wörterbuch der deutschen Sprachen. Mannheim, Wien, Zürich: Dudenverlag; s. bes. S. 1368 (Band 1363).
18. Eckstein, H.H. (2003): Die akute mesenteriale Ischämie. Resektion oder Rekonstruktion? Chirurg 74(5), 419-431.
19. Effenberger-Neidnicht, K., Jagers, J., Verhaegh, R., de Groot, H. (2014): Glycine selectively reduces intestinal injury during endotoxemia. J Surg Res 192(2), 592-598.
20. Ellis, J., Sarac, T.P. (2010): Acute mesenteric ischemia. Minerva Chir 65(3), 297-301.
21. Evins, A.E., Fitzgerald, S.M., Wine, L., Rosselli, R., Goff, D.C. (2000): Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia. Am J Psychiatry 157(5), 826-828.
22. Fink, M.P. (2003): Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. Curr Opin Crit Care 9(2), 143-151.
23. Frank, A., Rauen, U., de Groot, H. (2000): Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. J Hepatol 32(1), 58-66.
24. Granger, D.N., Hollwarth, M.E., Parks, D.A. (1986): Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. Acta Physiol Scand Suppl 548, 47-63.
25. Granger, D.N., Richardson, P.D., Kvietys, P.R., Mortillaro, N.A. (1980): Intestinal blood flow. Gastroenterology 78(4), 837-863.

26. Gundersen, R.Y., Vaagenes, P., Breivik, T., Fonnum, F., Opstad, P.K. (2005): Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand* 49(8), 1108-1116.
27. Hahn, R.G. (2006): Fluid absorption in endoscopic surgery. *Br J Anaesth* 96(1), 8-20.
28. Hahn, R.G., Nilsson, A., Stahle, L. (1999): Distribution and elimination of the solute and water components of urological irrigating fluids. *Scand J Urol Nephrol* 33(1), 35-41.
29. Hebel, R., Stromberg, M. W. (1986): Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wörthsee: BioMed Verlag; s. bes. S. 81.
30. Heyman, S.N., Brezis, M., Epstein, F.H., Spokes, K., Rosen, S. (1992): Effect of glycine and hypertrophy on renal outer medullary hypoxic injury in ischemia reflow and contrast nephropathy. *Am J Kidney Dis* 19(6), 578-586.
31. Howard, A., Tahir, I., Javed, S., Waring, S.M., Ford, D., Hirst, B.H. (2010): Glycine transporter GLYT1 is essential for glycine-mediated protection of human intestinal epithelial cells against oxidative damage. *J Physiol* 588(Pt 6), 995-1009.
32. ICD-10-GM-Katalog. Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information, 2014; <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2014/block-k55-k64.htm>
33. Iijima, S., Shou, J., Naama, H., Calvano, S.E., Daly, J.M. (1997): Beneficial effect of enteral glycine in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg* 1(1), 61-67; discussion 67-68.
34. Iresjo, B.M., Korner, U., Larsson, B., Henriksson, B.A., Lundholm, K. (2006): Appearance of individual amino acid concentrations in arterial blood during steady-state infusions of different amino acid formulations to ICU patients in support of whole-body protein metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30(4), 277-285.
35. Jacob, T., Ascher, E., Hingorani, A., Kallakuri, S. (2003): Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery* 134(3), 457-466.
36. Jennings, R.B. (1970): Myocardial ischemia--observations, definitions and speculations. *J Mol Cell Cardiol* 1(4), 345-349.

37. Kallakuri, S., Ascher, E., Pagala, M., Gade, P., Hingorani, A., Scheinman, M., Mehraein, K., Jacob, T. (2003): Protective effect of glycine in mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model. *J Vasc Surg* 38(5), 1113-1120.
38. Kanda, T., Fujii, H., Tani, T., Murakami, H., Suda, T., Sakai, Y., Ono, T., Hatakeyama, K. (1996): Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology* 110(2), 339-343.
39. Klar, E., Rahmanian, P.B., Bucker, A., Hauenstein, K., Jauch, K.W., Luther, B. (2012): Akute mesenteriale Ischämie – ein vaskulärer Notfall. *Dtsch Arztebl Int* 109(14), 249-256.
40. Kluthe, B.: Glycin. Deutsches Ernährungsberatungs- und -informationsnetz 2014; <http://www.ernaehrung.de/lexikon/images/glycin.png>
41. Knichwitz, G., Kruse, C., van Aken, H. (2005): Intestinale Perfusionsstörungen beim Intensivpatienten. *Anaesthesist* 54(1), 41-48.
42. Kornblith, P.L., Boley, S.J., Whitehouse, B.S. (1992): Anatomy of the splanchnic circulation. *Surg Clin North Am* 72(1), 1-30.
43. Krueger, A.J., Yang, J.J., Roy, T.A., Robbins, D.J., Mackerer, C.R. (1990): An automated myeloperoxidase assay. *Clin Chem* 36(1), 158.
44. Kuzu, M.A., Koksoy, C., Kale, I.T., Tanik, A., Terzi, C., Elhan, A.H. (1998): Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J Surg* 176(4), 348-351.
45. Lanciault, G., Jacobson, E.D. (1976): The gastrointestinal circulation. *Gastroenterology* 71(5), 851-873.
46. Lee, M.A., McCauley, R.D., Kong, S.E., Hall, J.C. (2001): Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic-reperfusion injury in the rat. *Ann Plast Surg* 46(3), 320-326.
47. Lee, M.A., McCauley, R.D., Kong, S.E., Hall, J.C. (2002): Influence of glycine on intestinal ischemia-reperfusion injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26(2), 130-135.
48. Lundgren, O., Haglund, U. (1978): The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. *Life Sci* 23(14), 1411-1422.
49. Luther, B.L.P. (2001): Intestinale Durchblutungsstörungen. Mesenterialinfarkt. Angina abdominalis. Therapieoptionen. Prognosen. Darmstadt: Steinkopff-Verlag; s. bes. S. 39-51.

50. Luther, B.L.P. (2011): Kompaktwissen Gefäßchirurgie: Differenzierte Diagnostik und Therapie. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; s. bes. S. 165-172.
51. Mallick, I.H., Yang, W., Winslet, M.C., Seifalian, A.M. (2004): Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 49(9), 1359-1377.
52. Mangino, J.E., Kotadia, B., Mangino, M.J. (1996): Characterization of hypothermic intestinal ischemia-reperfusion injury in dogs. Effects of glycine. *Transplantation* 62(2), 173-178.
53. Marsh, D.C., Hjelmhaug, J.A., Vreugdenhil, P.K., Belzer, F.O., Southard, J.H. (1991): Glycine prevention of cold ischemic injury in isolated hepatocytes. *Cryobiology* 28(1), 105-109.
54. McCord, J.M. (1985): Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312(3), 159-163.
55. Megison, S.M., Horton, J.W., Chao, H., Walker, P.B. (1990): Prolonged survival and decreased mucosal injury after low-dose enteral allopurinol prophylaxis in mesenteric ischemia. *J Pediatr Surg* 25(8), 917-921.
56. Menger, M.D., Steiner, D., Messmer, K. (1992): Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 263(6 Pt 2), H1892-1900.
57. Miller, G.W., Lock, E.A., Schnellmann, R.G. (1994): Strychnine and glycine protect renal proximal tubules from various nephrotoxicants and act in the late phase of necrotic cell injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 125(2), 192-197.
58. Mitsudo, S., Brandt, L.J. (1992): Pathology of intestinal ischemia. *Surg Clin North Am* 72(1), 43-63.
59. Nishimura, Y., Lemasters, J.J. (2001): Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ* 8(8), 850-858.
60. Oldenburg, W.A., Lau, L.L., Rodenberg, T.J., Edmonds, H.J., Burger, C.D. (2004): Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med* 164(10), 1054-1062.
61. Oltean, M., Pullerits, R., Zhu, C., Blomgren, K., Hallberg, E.C., Olausson, M. (2007): Donor pretreatment with FK506 reduces reperfusion injury and accelerates intestinal graft recovery in rats. *Surgery* 141(5), 667-677.

62. Park, P.O., Haglund, U., Bulkley, G.B., Falt, K. (1990): The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 107(5), 574-580.
63. Patel, A., Kaleya, R.N., Sammartano, R.J. (1992): Pathophysiology of mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 72(1), 31-41.
64. Petrat, F., Boengler, K., Schulz, R., de Groot, H. (2012): Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. *Br J Pharmacol* 165(7), 2059-2072.
65. Petrat, F., Drowatzky, J., Boengler, K., Finckh, B., Schmitz, K.J., Schulz, R., de Groot, H. (2011): Protection from glycine at low doses in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *Eur Surg Res* 46(4), 180-187.
66. Petrat, F., Swoboda, S., de Groot, H., Schmitz, K.J. (2010): Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. *J Invest Surg* 23(4), 208-217.
67. Pschyrembel, W. (2012): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2013 Berlin: De Gruyter; s. bes. S. 1029; 1320-1321.
68. Rajendra, S., Lynch, J.W., Schofield, P.R. (1997): The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 73(2), 121-146.
69. Ritz, J.P., Buhr, H.J. (2011): Akute mesenteriale Ischämie. *Chirurg* 82(10), 863-866, 868-870.
70. Robinson, J.W., Mirkovitch, V., Winistorfer, B., Saegesser, F. (1981): Response of the intestinal mucosa to ischaemia. *Gut* 22(6), 512-527.
71. Rosenblum, J.D., Boyle, C.M., Schwartz, L.B. (1997): The mesenteric circulation. Anatomy and physiology. *Surg Clin North Am* 77(2), 289-306.
72. Schmidt, R.F., Thews, G. (1997): Physiologie des Menschen. 27. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; s. bes. S. 77, 519, 780, 840.
73. Schneider, T.A., Longo, W.E., Ure, T., Vernava, A.M., 3rd (1994): Mesenteric ischemia. Acute arterial syndromes. *Dis Colon Rectum* 37(11), 1163-1174.

74. Schoenberg, M.H., Beger, H.G. (1990): Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact* 76(2), 141-161.
75. Schwilden, E.-D. (2006): Anatomie und Physiologie im Splanchnikusgebiet. *Gefäßchirurgie* 11, 148-158.
76. Simpson, R., Alon, R., Kobzik, L., Valeri, C.R., Shepro, D., Hechtman, H.B. (1993): Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 218(4), 444-453; discussion 453-444.
77. Sise, M.J. (2014): Acute mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 94(1), 165-181.
78. Venkatachalam, M.A., Weinberg, J.M., Patel, Y., Saikumar, P., Dong, Z. (1996): Cytoprotection of kidney epithelial cells by compounds that target amino acid gated chloride channels. *Kidney Int* 49(2), 449-460.
79. Vollmar, B., Menger, M.D. (2011): Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 396(1), 13-29.
80. Walensi, M., de Groot, H., Schulz, R., Hartmann, M., Petrat, F. (2013): Mesenteric ischemia-reperfusion injury: clearly improved hemodynamics but only minor protection of the rat small intestine by (sub)therapeutic heparin sodium and enoxaparin doses. *J Surg Res* 179(1), iE57-69.
81. Wallner, H. (2008): Intestinale Ischämie - akute und chronische Verlaufsformen. *Zeitschrift für Gefäßchirurgie* 5, 11-14.
82. Wang, G., Zhao, M., Wang, E.H. (2004): Effects of glycine and methylprednisolone on hemorrhagic shock in rats. *Chin Med J (Engl)* 117(9), 1334-1341.
83. Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., Wu, G. (2013): Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids* 45(3), 463-477.
84. Weinberg, J.M., Davis, J.A., Abarzua, M., Rajan, T. (1987): Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin Invest* 80(5), 1446-1454.
85. Wetzels, J.F., Yu, L., Shanley, P.F., Burke, T.J., Schrier, R.W. (1993): Infusion of glycine does not attenuate in vivo ischemic acute renal failure in the rat. *J Lab Clin Med* 121(2), 263-267.

86. Wheeler, M.D., Ikejima, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R.F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M.L., Rusyn, I., Bradford, B., Thurman, R.G. (1999): Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 56(9-10), 843-856.
87. Wolf, A.M., Henne-Bruns, D. (2003): Mesenteriale Ischämie. *Chirurgische Epidemiologie – wann muss man daran denken?* *Chirurg* 74(5), 395-398.
88. Yasuhara, H. (2005): Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 35(3), 185-195.
89. Yin, M., Zhong, Z., Connor, H.D., Bunzendahl, H., Finn, W.F., Rusyn, I., Li, X., Raleigh, J.A., Mason, R.P., Thurman, R.G. (2002): Protective effect of glycine on renal injury induced by ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 282(3), F417-423.
90. Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendahl, H., Bradford, B., Lemasters, J.J. (2003): L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(2), 229-240.
91. Zimmerman, B.J., Granger, D.N. (1992): Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 72(1), 65-83.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	<i>Arterial/Arteriae</i>
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary Unit</i> , gerätespezifische/verfahrensdefinierte, relative Einheit
bzw.	beziehungsweise
I	Ischämie
I/R	Ischämie/Reperfusion
IE	Internationale Einheit
KGW	Körpergewicht
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid (=Kochsalzlösung)
O ₂ C	<i>Oxygen to see</i>
s.	siehe
V.	<i>Vena</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapiealgorithmus der akuten mesenterialen Ischämie.....	12
Abbildung 2: Arterien des Gastrointestinaltraktes der Ratte	15
Abbildung 3: Kollateralen der <i>A. mesenterica superior</i>	16
Abbildung 4: Strukturformel von Glycin	24
Abbildung 5: Zeitlicher Versuchsablauf der Hauptversuchsserie (Serie 1)	32
Abbildung 6: Arbeitsplatz und Versuchsaufbauten	36
Abbildung 7: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf die Vitalparameter von Ratten während der segmentalen, absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion des Dünndarms (Serie 1).....	46
Abbildung 8: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf den Mikrozirkulationsparameter Sauerstoffsättigung während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion	49
Abbildung 9: Effekte von intravenös infundiertem Glycin auf den Mikrozirkulationsparameter Blutfluss während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion	51
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Glycinkonzentration im Rattenblutplasma während der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion (Serie 1).....	53

Abbildung 11: Effekte von Glycin auf das Dünndarmgewicht von Ratten am Ende der absoluten mesenterialen Ischämie und Reperfusion (Serie 1)	54
Abbildung 12: Effekte von Glycin auf die gewichtsabhängige Längenänderung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion	55
Abbildung 13: Effekte von Glycin auf das Ausmaß der Gewebeödembildung in der Dünndarmwand der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion (Serie 1).....	57
Abbildung 14: Effekte von Glycin auf die makroskopisch quantifizierte Schädigung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion	59
Abbildung 15: Effekte von Glycin auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmgewebes der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion	61
Abbildung 16: Effekte von Glycin auf die Saccharase-Aktivität als Maß der funktionellen Integrität der ausgelagerten Dünndarmsegmente der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion (Serie 1).....	63
Abbildung 17: Effekte von Glycin auf die Myeloperoxidase-Aktivität als Maß für die Präsenz neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion	64
Abbildung 18: Effekte von Glycin auf den Chiu-Park-Score als Maß für die histologisch quantifizierbare Schädigung des Dünndarms der Ratte nach absoluter mesenterialer Ischämie und Reperfusion.....	66

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitliche Entwicklung der intestinalen Organnekrose bei kompletter Ischämie und ihre Prognose	23
Tabelle 2: Pharmaka und Chemikalien.....	28
Tabelle 3: Hilfsmittel und Geräte	31
Tabelle 4: Charakterisierung der Versuchsgruppen	33

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt allen an dieser Dissertation beteiligten Personen und Instituten:

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert de Groot, dem leitenden Direktor des Instituts für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen, für das Ermöglichen der vorliegenden Arbeit durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Dissertation, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Petrat, für die Überlassung des Themas, sein außerordentliches Engagement bei der Betreuung meiner Dissertation sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Marietheres Marxer und Frau Kristina Piwellek für die Einarbeitung in die chirurgischen Operationsmethoden und die Hilfe bei der Aufbereitung der histologischen Präparate. Frau Natalie Boschenkov danke ich für die histologische Gegenbefundung der histologischen Präparate. Zudem möchte ich Herrn Tobias Müller, Herrn Dr. rer. nat. Tim Hamburger, Herrn Dr. rer. nat. Thomas Rönn und Herrn Falk Kähler danken, die für meine kleineren und größeren Probleme immer ein offenes Ohr hatten.

Dem Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen danke ich für die Hilfe bei der histologischen Aufbereitung der Dünndarmpräparate.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Barbara Finckh, die am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf die Aminosäurenspiegel-Bestimmungen durchführte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund und meiner Familie, die mich immer vorbehaltlos unterstützen und ohne deren Hilfe, Motivation und Liebe es nicht möglich gewesen wäre, das Medizinstudium zu absolvieren und mir so den Weg zur Promotion erst ermöglicht haben.

7.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.